

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Aspetti igienico-sanitari
delle acque destinate al consumo umano**

A cura di
Enzo Funari e Massimo Ottaviani
Laboratorio di Igiene Ambientale

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

97/9

Istituto Superiore di Sanità

Aspetti igienico-sanitari delle acque destinate al consumo umano.

A cura di Enzo Funari e Massimo Ottaviani

1997, iii, 174 p. Rapporti ISTISAN 97/9

La problematica della qualità igienico-sanitaria dell'acqua potabile è assai complessa e articolata. Non può che essere affrontata con un approccio integrale, basato su più competenze in discipline tra loro anche molto diverse. Si riportano gli aspetti normativi della problematica delle acque potabili indicando, in particolare, le prospettive contenute nella recente proposta di Direttiva CEE. Sono affrontati alcuni degli aspetti critici principali del rischio sanitario associato alla possibile esposizione attraverso l'acqua potabile a sostanze chimiche (cancerogene e non) e ad agenti biologici (batteri, virus, alghe, micro e macroinvertebrati). Sono esaminate, infine, alcune delle misure preventive e di controllo necessarie per assicurare la qualità delle acque distribuite per il consumo (tecniche di captazione, processi di potabilizzazione, protezione delle acque sotterranee).

Parole chiave: Acque potabili, Contaminazione chimica, Contaminazione microbiologica, Legislazione

Istituto Superiore di Sanità

Hygienic and health aspects of drinking water.

Edited by Enzo Funari and Massimo Ottaviani

1997, iii, 174 p. Rapporti ISTISAN 97/9 (in Italian)

The quality of drinking water is a rather complex issue and involves various disciplines. To adequately treat this problem, it is necessary to use an integrated approach. The normative aspects of the problem of drinking water are reported, indicating, in particular, the perspectives included in the recent EEC proposal. Some of the main aspects of the risk to human health associated with the possible exposure, through drinking water, to chemical substances (carcinogenic and non carcinogenic), and biological agents (bacteria, viruses, algae, micro and macroinvertebrates) are presented. Finally, some aspects of risk management are examined in order to indicate the preventive and control measures necessary to ensure the quality of drinking water (abstraction techniques, treatment processes, protection of groundwater).

Key words: Drinking water, Chemical contamination, Microbial contamination, Legislation

INDICE

Presentazione	pag.	iii
Revisione della normativa comunitaria sulle acque potabili: implicazioni normative e tecniche Massimo Ottaviani, Nicola Sarti	“	1
Regolamentazione europea sui materiali a contatto degli alimenti anche in relazione alle acque potabili e prospettive future Luigi Rossi	“	9
Aspetti critici della contaminazione delle acque potabili Enzo Funari	“	19
Cancerogeni nelle acque potabile Romano Zito	“	24
Associazione tra tumore della vescica ed esposizione ad arsenico attraverso l'acqua potabile: evidenze disponibili. Ivano Iavarone, Roberta Pirastu, Pietro Comba	“	28
Batteri ambientali patogeni opportunisti in acque potabili Lucia Bonadonna	“	42
I virus nell'acqua Michele Muscillo, Giuseppina La Rosa	“	50
Cianofeece tossiche e tecniche di rilevamento delle tossine nelle acque potabili Milena Bruno	“	71
Alghe nelle acque potabili Paola Margherita Bianca Gucci	“	83
Micro e macroinvertebrati nelle acque potabili Irene Di Girolamo	“	92
Tecniche di captazione delle acque a scopo potabile Anna Santarsiero	“	98
Ottimizzazione e controllo del processo di disinfezione Ivo Fagherazzi, Gianni Andreottola, Giuliano Ziglio	“	105

Sopravvivenza e ricrescita batterica in rete: biofilm e biocorrosione Francesca Anna Aulicino	pag.	124
Criteri di qualità dei prodotti chimici usati in acquedottistica Osvaldo Conio, Massimo Ottaviani	“	134
Qualità delle acque sotterranee: metodi di prevenzione e controllo Adriano Zavatti	“	147

Presentazione

Questo Rapporto Istisan raccoglie in forma di articoli le relazioni del I Corso dell'Istituto Superiore di Sanità su "Acque destinate al consumo umano: aspetti igienico-sanitari, normativi e linee guida dell'OMS", del 1995.

Il corso si è avvalso delle esperienze maturate nei corsi ISS precedenti "Aspetti microbiologici e chimici delle acque destinate al consumo umano" e "Linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità per la qualità dell'acqua potabile: aspetti scientifici e possibili implicazioni normative".

Il corso, che da parte degli attuali Direttori si intende tenere anche nei prossimi anni, si rivolge ai responsabili di strutture del Servizio Sanitario Nazionale nel settore della prevenzione e del controllo igienico-sanitario delle acque destinate al consumo umano ed affronta aspetti di base della problematica delle acque potabili, informando sugli aspetti più recenti e attuali dal punto di vista scientifico e normativo. Al corso, oltre ai relatori interni dell'ISS ed agli esperti dell'OMS, erano presenti anche relatori di strutture nazionali esterni con competenze specifiche nei principali settori dell'argomento trattato, nonché funzionari del Ministero della Sanità e, a partire dal corso del 1996, funzionari del Ministero dell'Ambiente.

Il presente Rapporto, per problemi organizzativi, contiene soltanto una parte delle relazioni presentate al Corso del 1995. Il risultato è un testo, forse, non completo, tuttavia con contributi indubbiamente interessanti. Nel rapporto vengono infatti trattati alcuni degli aspetti principali relativi alla valutazione del rischio chimico e microbiologico associato al consumo dell'acqua potabile e alla gestione di questi rischi.

Dott. Enzo Funari

Dott. Massimo Ottaviani

REVISIONE DELLA NORMATIVA COMUNITARIA SULLE ACQUE POTABILI: IMPLICAZIONI NORMATIVE E TECNICHE

Massimo Ottaviani⁽¹⁾, Nicola Sarti⁽²⁾

⁽¹⁾Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

⁽²⁾Direzione Generale Servizio Igiene Pubblica, Ministero della Sanità, Roma

L'attuale normativa in tema di acqua potabile trae la sua origine dalla direttiva 80/778/CEE [1], concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, la quale era stata elaborata su una proposta del 1975 e che, pertanto, rispecchia le conoscenze scientifiche e tecnologiche di tale periodo.

Nelle direttiva gli aspetti igienico-sanitari, in linea di massima, sono stati tenuti in debito conto, ma la distinzione fra parametri a valenza sanitaria e quelli a valenza estetico-organolettica appare a alquanto sfumata e non sempre ben evidente. Inoltre, non fornisce agli Stati Membri un quadro giuridico adeguato, cui far riferimento per risolvere le eventuali inadempienze alle varie norme sulla qualità dell'acqua distribuita.

La normativa nazionale che ne è derivata (DPR 236/88) [2] risente di tale impostazione, infatti solo per alcuni parametri (Ammoniaca, Ferro, Manganese, Rame e Zinco) viene precisato esplicitamente quali concentrazioni superiori ai valori-limite possono apportare modificazioni dei caratteri organolettici. Anche per quanto concerne le sanzioni per chi fornisce acqua non rispondente ai requisiti di qualità previsti nell'allegato I, si rileva che esse non sono differenziate fra quelle previste per parametri organolettici e quelle previste per parametri igienico-sanitari, pur prevedendo una gamma di sanzioni che, tuttavia, si prestano ad interpretazioni non omogenee.

Al fine di eliminare tali difetti e di aggiornare la direttiva vigente, il Consiglio Europeo del dicembre 1993, impegnava la Commissione ad avviare una radicale revisione della suddetta direttiva.

L'orientamento dato all'impostazione della nuova direttiva [3] è stato quello di puntare all'individuazione di una serie di parametri essenziali in materia di qualità e tutela della salute, lasciando agli Stati Membri di definire ulteriori parametri secondari qualora ne riscontrino la necessità.

Obiettivo dichiarato della revisione della direttiva è stato quello di tutelare l'acqua fornita al consumatore non quello di tutelare le risorse idriche, la cui protezione invece, sarà oggetto della futura revisione della direttiva 80/68/CEE [4] concernente la protezione delle acque sotterranee dall'inquinamento provocato da certe sostanze pericolose.

Inoltre, la revisione della direttiva 80/778/CEE è stata resa conforme al principio di sussidiarietà e di precauzionalità previsto dal trattato sull'Unione Europea sottoscritto a Maastricht.

Sommariamente, la revisione propone le seguenti principali modifiche:

Eliminazione valori guida. - Una prima constatazione che si può fare è la scomparsa dei valori-guida. In effetti, nella direttiva vigente, il significato di tali valori non è omogeneo nei vari parametri, per cui in certi casi si possono ritenere come valori ottimali ma in altri casi hanno un significato non ben definito. Si può notare poi che non sempre è stata data una interpretazione giuridica corretta a tali valori.

Riduzione del numero di parametri. - Il numero complessivo dei parametri relativi alla qualità delle acque elencati nell'allegato I è stato ridotto dai 67 della direttiva 80/778/CEE ai 48 contenuti nella proposta. Tra questi figurano 13 nuovi parametri aggiunti per adeguare il testo all'evoluzione scientifica.

Sono inclusi tutti quei parametri ritenuti fondamentali per continuare a garantire un adeguato livello di protezione della salute. Ove le condizioni locali lo richiedano o si ritenga opportuno, gli Stati Membri possono fissare valori per altri parametri atti a tutelare la salute umana.

I parametri sono stati suddivisi in tre gruppi:

Parte A - Parametri microbiologici (Tabella 1)

Parte B - Parametri chimici (Tabella 2)

Parte C - Parametri indicatori (Tabella 3)

Tabella 1. - *Valori dei parametri microbiologici previsti dalla proposta di direttiva, dalle ultime raccomandazioni dell'OMS e dalla normativa Italiana.*

Parametri Microbiologici	Unità di misura	CEE valore parametrico	OMS valore guida	DPR 236/88 CMA
E. Coli	n/100 mL	0	-	0
Streptococchi fecali	n/100 mL	0	-	0
Clostridio solfito-riduttore	n/20 mL n/100 mL	0 -	- -	- 0

Tabella 2. - Valori dei parametri chimici previsti dalla proposta di direttiva, dalle ultime raccomandazioni dell'OMS e dalla normativa Italiana.

Parametri chimici	Unità di misura	CEE valore parametrico	DPR 236/88 CMA	OMS valore guida
Acrilammide	µg/L	0.25	-	-
Antimonio	µg/L	3	10	5
Arsenico	µg/L	10	50	10
Benzene	µg/L	1	-	-
Boro	µg/L	300 (1)	1000	300
Bromato	µg/L	10	-	25
Bromodichlorometano	µg/L	15 (2)	-	60
Cadmio	µg/L	5	5	3
Cloroformio	µg/L	40 (2)	-	200
Cromo	µg/L	50	50	50
Rame	mg/L	2 (1)	1	2
Cianuro	µg/L	50	50	70
1.2 dicloroetano	µg/L	3	-	50
Epicloridrina	µg/L	0.5	-	0.4
Fluoruro	mg/L	1.5	1.5	1.5
Piombo	µg/L	10 (3)	50	10
Mercurio	µg/L	1	1	1
Nickel	µg/L	20	50	20
Nitrato	mg/L	50 (4)	50	50
Nitriti	mg/L	0.1 (4)	0.1	3
Pesticidi (antiparassitari)	µg/L	0.1 (5)	0.1	-
Idrocarburi policiclici aromatici	µg/L	0.2 (6)	0.2	-
Selenio	µg/L	10	10	10
Tetracloroetilene	µg/L	40	-	40
Tricloroetilene	µg/L	70	-	70
Cloruro di vinile	µg/L	0.5	-	5

Nota 1: I valori e la classificazione di questi parametri possono essere modificati alla luce dei nuovi dati scientifici che si presume saranno disponibili tra breve.

Nota 2: I campioni per questi parametri devono essere prelevati dopo essere stati a contatto con il cloro (la durata del contatto è rilevante); il campionamento deve effettuarsi nel punto in cui l'acqua esce dall'impianto di trattamento. Se necessario, il valore parametrico del bromodichlorometano può essere aumentato a 25 µg/L, a condizione che si riduca il valore del cloroformio a 30 µg/L.

Nota 3: Questo valore si riferisce ad un campione rappresentativo di acqua di rubinetto e deve essere soddisfatto al più tardi 15 anni dopo la data di entrata in vigore della presente direttiva. Nell'attuazione delle misure intese a garantire il raggiungimento del valore in questione, gli Stati membri danno priorità alle zone in cui la concentrazione di piombo nelle acque destinate al consumo umano è elevata.

Nota 4: Ove viene praticata clorazione, questi valori parametrici possono essere sostituiti da un valore di 0,5 per i nitriti e dalla seguente condizione $[\text{nitrati}]/50 + [\text{nitriti}]/3 \leq 1$, dove le parentesi quadre esprimono la concentrazione in mg/L.

Tabella 2 segue

Nota 5: a) Per antiparassitari s'intende: insetticidi organici; erbicidi organici; fungicidi organici; nematocidi organici; acaricidi organici; algicidi organici e prodotti connessi (regolatori della crescita).

b) Il valore parametrico si riferisce ad ogni singolo antiparassitario.

c) Il controllo è necessario solo per gli antiparassitari che hanno maggiore probabilità di trovarsi in un determinato approvvigionamento d'acqua.

d) La Commissione esaminasse sia possibile fissare un singolo valore per una determinata sostanza, previa valutazione dei dati scientifici dei dati scientifici disponibili.

Nota 6: I composti specifici sono i seguenti: benzo(a)pirene; fluorantene; benzo(b)fluorantene; benzo(k)fluorantene; benzo(ghi)perilene; indeneo (1,2,3,-cd)pirene.

Tabella 3. - Valori dei parametri indicatori previsti dalla proposta di direttiva, dalle ultime raccomandazioni dell'OMS e dalla normativa Italiana.

Parametri indicatori	Unità di misura	CEE valore parametrico	DPR 236/88 CMA	OMS valore guida
Alluminio	µg/L	200	200	200
Ammonio	mg/L	0.5	0.5	1.5
Colore	-	accettabile	20 Pt/Co	-
Conducibilità	µS/cm	2500	-	-
Ossigeno disciolto	%	≥50	-	-
Concentrazione	pH	6.9-9.5	6.5-8.5	-
Ioni Idrogeno				
Ferro	µg/L	200	200	300
Manganese	µg/L	50	50	500
Odore	-	accettabile	diluizione 2/3	accettabile
Ossidabilità	mg/L O ₂	5	5	-
Solfati	mg/L	250	250	250
Sapore	-	accettabile	diluizione 3	accettabile
Coliformi totali	n/100 mL	0	0	-
Carbonio tot (TOC)	mg/L	4	-	-
Torbidità	NTU/SiO ₂	accettabile	10 SiO ₂	5 NTU

I primi due tipi di parametri sono stati inseriti perché hanno una relazione diretta con la protezione della salute umana.

La parte A contiene un elenco di parametri che non sono patogeni in sé, ma che indicano la possibile presenza di microrganismi patogeni. I suddetti parametri e i relativi valori corrispondono a quelli della direttiva 80/778/CEE. Il parametro "coliformi fecali"

è stato sostituito dall'*Escherichia coli*, per definire il parametro con maggiore precisione, in linea con il progresso scientifico.

Per la Commissione non esiste alcun limite tollerabile che possa ritenersi sicuro per quanto riguarda la contaminazione microbiologica. Per questo motivo il valore per gli organismi indicatori è pari a zero in un volume specifico di acqua.

Per quanto concerne l'elenco della parte B, i parametri prescelti sono stati quelli che si possono più frequentemente trovare nelle acque degli Stati della comunità e che potrebbero rappresentare una minaccia particolarmente grave dal punto di vista igienico-sanitario. Comunque, nella maggior parte dei casi gli effetti previsti scientificamente sulla salute sono di natura cronica piuttosto che acuta.

I parametri della parte C si riferiscono a sostanze che, in sé e ai valori proposti, non presentano un rischio per la salute umana: essi sono stati inseriti per fornire un'indicazione tempestiva delle variazioni nella qualità dell'acqua e dell'eventuale necessità di adottare azioni di prevenzione.

Revisione dei valori parametrici. - Questo intervento ha tenuto conto dei recenti orientamenti dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) [5] e delle variazioni delle condizioni ambientali registrate in questo settore in tutta l'Unione.

Come detto, i valori parametrici sono stati ricavati dai dati scientifici disponibili oppure, se i valori così ottenuti sono risultati inferiori a quelli che si possono ottenere con i metodi di trattamento a disposizione, sul valore più basso ottenibile nella pratica. Nei casi in cui i dati scientifici esistenti siano stati ritenuti insufficienti è stato adottato un principio precauzionale.

Tra i valori parametrici sottoposti a revisione figurano quelli del piombo, dei nitrati e degli antiparassitari.

Per il piombo e i nitrati, nella revisione si propongono valori sostanzialmente in linea con gli orientamenti dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Rispetto alla direttiva attualmente in vigore, il valore per i nitrati rimane invariato, mentre quello relativo al piombo viene ridotto dell'80% (10 µg/L). La modifica, è stata resa conforme alle recenti raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità ed è stata introdotta innanzitutto per proteggere i neonati, i bambini e le donne incinta contro gli effetti tossici per il sistema nervoso che, come dimostrato, hanno conseguenze sul QI e causano problemi di apprendimento e comportamentali. E' stato ritenuto quindi, che questi benefici superino di gran lunga i costi di adempimento previsti. Infatti, tale raccomandazione pur essendo intesa principalmente ad evitare l'accumulo di piombo nei bambini, è destinata a proteggere tutti i gruppi di età. Per conformare l'acqua al rubinetto al nuovo valore fissato per il piombo sarà necessario sostituire le condutture e i raccordi di piombo. Stime preliminari effettuate dalla Commissione, calcolano che il costo totale dell'operazione si aggirerà intorno ai 70 Mrd di Ecu. Per tale motivo, è stato proposto un periodo di 15 anni per consentire agli Stati Membri di conformarsi a questi parametri; essi avranno anche una certa libertà di procedere gradualmente agli investimenti necessari. Potranno inoltre decidere i tempi per la sostituzione delle condutture e dei raccordi di piombo negli impianti domestici.

Per gli antiparassitari, nella revisione si propone di mantenere, per principio, l'attuale valore precauzionale di 0,1 µg/L per ogni singolo antiparassitario e 0,5 µg/L complessivi.

Per quanto riguarda i parametri e i dati utilizzati nei valori guida dell'OMS è stato ritenuto che essi non possano garantire un sufficiente margine di sicurezza per l'Unione Europea. I valori definiscono infatti i limiti di concentrazione superiori esaminando ogni sostanza isolatamente, mentre mancano quasi del tutto i dati sulla tossicità di combinazioni di singoli antiparassitari.

Pertanto, nella revisione è stato adottato un approccio prudente e precauzionale, evitando, in questa fase, di presentare modifiche al valore parametrico relativo ai singoli antiparassitari.

Secondo la Commissione l'esperienza ha dimostrato come sia quasi sempre possibile rispettare questo valore senza trattamenti supplementari, se i prodotti in questione vengono usati con consapevolezza.

Nella proposta di revisione della direttiva figurano alcuni parametri nuovi rispetto alla direttiva vigente come: acrilamide con limite 250 µg/L, benzene 1 µg/L, il boro 300 µg/L, bromato 250 µg/L, benzene 1 µg/L, cloroformio 40 µg/L, 1,2 dicloroetano 3 µg/L, epicloridrina 0,5 µg/L, tetracloroetilene 40 µg/L, tricloroetilene 70 µg/L e cloruro di vinile 0,5 µg/L. Tali sostanze sono state inserite perché risultano essere cancerogene e o fortemente tossiche. Inoltre, è stata accertata la loro frequente presenza nelle acque trattate e non dell'Unione Europea. I valori parametrici proposti sono cautelativi anche rispetto ai valori consigliati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, considerando che la Commissione ha normalmente adottato un livello massimo statisticamente accettabile di aumento di rischio di cancro dovuto all'esposizione alla singola sostanza cancerogena per l'intera vita, ad un caso per milione di abitanti (1×10^{-6}).

Per altri vengono, invece, proposti limiti più restrittivi come: antimonio da 10 a 3 µg/L, arsenico da 50 a 10 µg/L, nichel da 50 a 20 µg/L. Per i rimanenti vengono mantenuti gli stessi limiti: cadmio 5 µg/L, cromo 50, fluoro 1,5 mg/L, mercurio 1 µg/L e nitriti 0,1 mg/L, idrocarburi policiclici aromatici 0,2 µg/L, selenio 10 µg/L. Per il rame il limite è aumentato a 2 mg/L.

Poi, infine, vengono riportati altri sedici parametri ritenuti meno importanti e valutati come indicatori i cui valori di concentrazioni vengono mantenuti sostanzialmente simili ai precedenti (Tabella 3).

Maggiore trasparenza. - La Commissione ha proposto di aumentare la trasparenza nell'attuazione della direttiva aumentando la frequenza delle relazioni, che da triennali diventeranno annuali (modifica della direttiva 80/778/CEE con la direttiva 91/692/CEE sulla standardizzazione delle relazioni). Sarà previsto, inoltre, l'obbligo di informare immediatamente i consumatori degli eventuali scostamenti dai valori fissati e dei possibili pericoli derivanti per la salute umana, oltre a raccomandare i provvedimenti che i consumatori stessi dovrebbero prendere.

Riconoscimento reciproco della qualità dell'acqua potabile. - La Commissione ha proposto che agli Stati Membri venga negata la possibilità di limitare o vietare la libera circolazione delle acque destinate al consumo umano conformi ai requisiti minimi fissati dalla direttiva, o dei prodotti alimentari in cui esse sono state utilizzate. Si tratta di un provvedimento necessario, onde evitare che il nuovo approccio comporti ostacoli agli scambi.

Semplificazione degli obblighi di controllo. - E' stata proposta una nuova serie di requisiti minimi per il controllo dell'acqua potabile, grazie ai quali gli Stati Membri potranno definire la quantità e il tipo di controllo in base alle condizioni locali. E' stato, inoltre, proposto di rivedere l'approccio ai metodi di analisi di riferimento da utilizzare per il controllo, consentendo il ricorso a qualsiasi metodo che risponda a determinate caratteristiche di prestazione piuttosto che imporre l'uso di metodologie determinate. In questo modo gli Stati Membri potranno adeguare i metodi prescelti all'evoluzione tecnica e scientifica, senza per questo dover modificare gli allegati della direttiva.

La proposta di revisione, sommariamente descritta, deve essere approfondita e quindi può essere modificata prima che diventi direttiva vera e propria.

Si vuole però richiamare l'attenzione su alcuni parametri nuovi o per i quali si propongono limiti più restrittivi di quelli vigenti e che trovano fondamento nelle linee-guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità.

Si tratta dei trialometani e dei composti organoalogenati come 1, 2 dicloetano, epicloridrina, tetracloroetilene, tricloroetilene e cloruro di vinile, nonché dell'acriloamide

Circa i trialometani e alcuni degli altri composti organoalogenati sopra menzionati, a livello nazionale, si hanno significative informazioni sulla loro presenza, mentre su altri sarebbe opportuno acquisire ulteriori e più approfondite conoscenze relativamente alla loro presenza riscontrata nelle acque potabili.

Per quanto concerne il boro ed il rame se da una parte, è necessario approfondire gli aspetti tossicologici e comunque di impatto sanitario od organolettico (come sta facendo attualmente, anche la Commissione dell'Unione Europea), dall'altra è opportuno acquisire anche per questi elementi, oltreché per il piombo, l'arsenico e l'antimonio, informazioni sulla loro presenza nell'approvvigionamento in atto. A proposito del boro, recentemente (20.02.96) il Comitato Scientifico della Commissione delle Comunità Europee per l'esame della tossicità e della Ecotossicità dei composti chimici (SCTE) alla luce di nuove osservazioni scientifiche ha indicato come concentrazione accettabile del boro nelle acque potabili 1mg/L. La Commissione, quindi, deciderà in futuro sui provvedimenti da intraprendere.

Per quanto riguarda le possibilità di concedere deroghe nella nuova proposta di direttiva non si prevede più la distinzione fra parametri ad arricchimento naturale e gli altri. Non è prevista la possibilità di deroga unicamente per i parametri microbiologici indicatori di inquinamento.

In effetti, la distinzione fra presenza ad arricchimento naturale e quella ad arricchimento antropico di una sostanza non trova sempre giustificazione in quanto,

anche per arricchimento naturale, può aversi una presenza inaccettabile di sostanza (come ad esempio nel caso dell'arsenico, del nichel e del fluoro).

In conclusione, anche in vista di ulteriori valutazioni sulla proposta di revisione della direttiva, che si prevede possa essere emanata entro un biennio, occorre a livello nazionale che venga approfondita la conoscenza sulla presenza dei parametri nuovi o di quelli per cui viene proposto un limite inferiore a quello vigente.

Tale conoscenza deve essere attuata non solo nell'acqua a livello di messa a disposizione dell'utente (contatore), ma anche a livello di rubinetto del consumatore, almeno per quei parametri che possono subire una modifica nel percorso dal contatore al rubinetto.

BIBLIOGRAFIA

1. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee n. L. 29 del 30 agosto 1980. Direttiva del Consiglio del 15 luglio 1980 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano.
2. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 152 del 10 giugno 1988. DPR 24 maggio 1988 n. 236. Attenzione della Direttiva CEE n. 80/778 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano.
3. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee n. L. 131 del 30 maggio 1995. Proposta di direttiva del Consiglio relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano.
4. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee n. L. 20 del 26 gennaio 1980. Direttiva del Consiglio 80/68 CEE relativa alla protezione delle acque sotterranee dell'inquinamento provocato da certe sostanze pericolose.
5. Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Direttive per la qualità per l'acqua potabile. Vol. 1° raccomandazioni. Ginevra, 1994.

REGOLAMENTAZIONE EUROPEA SUI MATERIALI A CONTATTO DEGLI ALIMENTI ANCHE IN RELAZIONE ALLE ACQUE POTABILI E PROSPETTIVE FUTURE

Luigi Rossi

Commissione Europea, Bruxelles

Durante la produzione e la distribuzione l'acqua viene a contatto con vari prodotti quali tubi, guarnizioni, serbatoi, cisterne, materiali verniciati. Questi prodotti possono essere fabbricati a partire di materiali polimerici, materiali metallici (ghisa, acciai, piombo zincato, rame) o inorganici del tipo amianto cemento (=eternit). Durante il trattamento per potabilizzare l'acqua sono anche utilizzate le resine a scambio ionico, filtri di varia natura e carbone attivo.

Tutti questi materiali possono influenzare la qualità dell'acqua in vario modo:

- ⇒ deteriorandone i caratteri organolettici (colore, sapore, odore);
- ⇒ alterandone la qualità microbiologica;
- ⇒ cedendo sostanze che possono alterarne la composizione e che possono, se tossiche, creare dei rischi per la salute umana.

Di qui l'esigenza sentita da vari governi di regolamentare il settore dei materiali a contatto dell'acqua. In questa relazione si prenderanno in considerazione solo gli aspetti relativi alla cessione delle sostanze.

La relazione del Dott. Sarti sicuramente chiarirà l'attuale situazione normativa italiana. Io mi limiterò viceversa ad esaminare le norme applicabili a livello europeo e soprattutto le sue prospettive future, che, come dimostrerò, sono abbastanza confuse. In effetti a livello comunitario si stanno riflettendo le incertezze e la mancanza di chiarezza che esiste spesso anche a livello nazionale. Incertezze e mancanza di chiarezza che dipendono, a mio parere, dal fatto che, pur essendo l'acqua potabile l'alimento primario della nostra dieta giornaliera, essa si configura anche come un servizio essenziale al pari della luce e del gas e pertanto ad essa si applicano delle regole particolari, che spesso non troviamo in altri alimenti. La normativa sull'acqua potabile è infatti differente dalla normativa sulle acque minerali e talora è più stringente. Perché? La spiegazione probabilmente risiede nel fatto che nella normativa sull'acqua potabile vi sono spesso due obiettivi da raggiungere e precisamente:

- ⇒ l'obiettivo sanitario cioè la protezione della salute umana dalla contaminazione chimica;
- ⇒ l'obiettivo ecologico cioè il mantenimento o il miglioramento della qualità chimica dell'acqua.

Tali obiettivi non sono sempre coincidenti e spesso l'obiettivo ecologico che si può riassumere nella clausola di precauzione "mantenere o ridurre la contaminazione al valore più basso che è possibile raggiungere in pratica" è più basso di quello sanitario. Di qui la difficoltà a capire la direttiva sull'acqua potabile ed il perché di certi limiti, essendo poco trasparente l'applicazione dell'uno o dell'altro obiettivo.

Ma passiamo ad esaminare subito la normativa europea sui materiali a contatto dell'acqua potabile. In effetti essa non esiste ancora, sebbene certi limiti o principi esistenti in alcune direttive siano d'applicazione a tali materiali. Avendo già accennato alla direttiva sull'acqua potabile ed alla sua recente proposta di modifica, occorre subito dire che i materiali a contatto con tali acque non potranno che essere di qualità tale da non consentire una cessione di contaminanti chimici superiori ai valori parametrici fissati all'allegato 1, parte B. Mi riferisco al valore del piombo, del rame, del nichel ecc. Evidentemente l'applicazione di tale principio comporta problemi di applicazione pratica, poiché non è detto che la causa del superamento sia da attribuire solo al materiale ma può essere il risultato di una contaminazione ambientale.

Accanto a questo principio generale occorre considerarne un altro che è valido per tutti i materiali a contatto con l'acqua potabile.

Tale principio è contenuto nella direttiva 89/109/CEE sui materiali destinati a contatto degli alimenti e che così recita:

" I materiali(non devono cedere) ai prodotti alimentati costituenti in quantità tale da:

- costituire un pericolo per la salute umana;
- comportare una modifica inaccettabile della composizione dei prodotti alimentari o un'alterazione dei loro caratteri organolettici".

Alcune direttive hanno chiarito il significato di tale principio generico precisando le norme di qualità da applicarsi ai materiali. Ma di tali direttive parleremo tra qualche minuto. A questo punto, è d'uopo precisare, che la direttiva 89/109/CEE che pur si applica in generale anche ai materiali destinati a contenere l'acqua non è d'applicazione per i materiali che costituiscono "gli impianti fissi, pubblici o privati, che servono per la distribuzione dell'acqua", in quanto si è ritenuto, per un a ragione di prudenza, che occorresse elaborare una normativa specifica per tali materiali. Pertanto ad esempio le tubazioni per il trasporto dell'acqua non rientrano per il momento nel campo di applicazione della regolamentazione comunitaria sui materiali a contatto degli alimenti.

Prima di esaminare le prospettive di una regolamentazione specifica comunitaria, occorre accennare all'attuale normativa comunitaria sui materiali a contatto degli alimenti, al fine di esaminare successivamente quanto essa possa servire di riferimento. I riferimenti legislativi figurano nell'allegato 1. Ai fini del nostro discorso ci limiteremo a descrivere le norme relative alle materie plastiche, che potrebbero essere successivamente estese ai materiali verniciati ed anche, mutatis mutandis, alle gomme.

La normativa sulle materie plastiche per alimenti si fonda sulla definizione di una lista positiva unica di sostanze autorizzate per tutte le materie plastiche e su un limite di cessione globale del materiale. Quest'ultimo parametro, pari a 60 ppm, serve ad

assicurare che l'alimento non sia eccessivamente contaminato dalle sostanze cedute dal materiale, anche se innocue. Per le sostanze che per il loro profilo tossicologico potrebbero presentare rischi per la salute al di sotto del limite di migrazione globale, sono fissati dei limiti di migrazione specifici in relazione alla loro dose giornaliera accettabile (DGA). Il valore numerico di tali limiti si ottiene moltiplicando per 60 la DGA perché, per il momento, si assume che un uomo mangi ogni giorno per 50 anni un chilogrammo di alimento in contatto con la materia plastica, il che è una esagerazione evidente e, pertanto la normativa va considerata piuttosto precauzionale.

Il controllo di entrambi i suddetti limiti viene effettuato utilizzando al posto dell'alimento dei solventi o comunque dei liquidi atti a simulare le capacità estrattive degli alimenti (acqua, acido acetico al 3%, etanolo al 15% e olio d'oliva). Inoltre le innumerevoli condizioni di durata e di temperatura sotto cui può avvenire il contatto tra l'alimento ed il materiale vengono sostituite da poche condizioni di contatto standard atte tuttavia a rappresentare le condizioni più sfavorevoli nel contatto reale. Ciò si ottiene prevedendo soprattutto alte temperature di contatto perché, come è noto, la migrazione delle sostanze è una funzione esponenziale della temperatura ed è invece proporzionale alla radice del tempo. Negli allegati 2, 3 e 4 vengono riportate le condizioni standard delle prove di cessione dei materiali. Pertanto, anche il metodo di controllo offre ulteriori margini di sicurezza sotto l'aspetto della protezione dell'uomo.

Ritornando alla lista positiva, va da sé che essa presuppone a monte una valutazione rigorosa della tossicità delle sostanze inserite. Pertanto, il fabbricante del monomero o dell'additivo che richiede l'aggiunta in lista di una sostanza deve presentare un fascicolo tecnico atto a permettere di stabilire una DGA. Tale fascicolo deve contenere i seguenti dati:

- ⇒ l'identità della sostanza;
- ⇒ i principali dati chimici e fisici per valutarne l'identità ed il comportamento alle varie condizioni d'uso;
- ⇒ la funzione della sostanza;
- ⇒ i dati di migrazione nelle condizioni d'uso estreme;
- ⇒ i dati tossicologici, che variano a seconda dei livelli di migrazione raggiunti nelle condizioni estreme e che sono:
 - ◆ tre saggi di mutagenesi, se la migrazione è inferiore a 50 ppb;
 - ◆ tre saggi di mutagenesi, la prova dell'assenza della bioaccumulazione ed una prova di tossicità orale di 90 giorni, se la migrazione si situa tra 50 ppb e 5 ppm;
 - ◆ per migrazioni superiori a 5 ppm occorre presentare prove di tossicità a lungo termine, studi sulla riproduzione, studi sulla teratogenicità, studi sull'assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione.

Il Comitato Scientifico dell'Alimentazione Umana, valuta i dati del composto e fissa la DGA e la direttiva riflette tali valori nel modo prima indicato moltiplicando cioè in genere tali valori per 60. In realtà il sistema è un po' più complesso perché non sempre sono stati disponibili nel passato i necessari dati tossicologici. Tuttavia, la normativa

comunitaria prevede in tali casi ulteriori restrizioni di impiego in modo da assicurare comunque che non vi siano rischi per la salute del consumatore.

La domanda che occorre porsi ora è la seguente: può questo sistema essere applicato agli impianti fissi, pubblici o privati, che servono per la distribuzione dell'acqua potabile attualmente esclusi dal campo di applicazione della direttiva? In linea di principio, e sempre limitandoci alle materie plastiche, si può dare una risposta affermativa anche se le condizioni di prova (simulanti e condizioni di contatto) dovrebbero essere adattate alle condizioni particolari esistenti nella rete di distribuzione dell'acqua. A livello di CEN il TC/164 working group 3 ha già elaborato dei documenti a tale riguardo, di cui, comunque dovrebbe essere tenuto conto o a cui si dovrebbe rinviare, se si ritenesse che essi siano sufficientemente cautelativi da tener conto degli elevati standard di sicurezza di cui una normativa si deve necessariamente fare carico. Essi prevedono che i materiali, per i quali è prevedibile un contatto con l'acqua a temperatura ambiente, siano sottoposti a tre attacchi di 72 ore a 23 °C e quelli, per i quali è prevedibile un contatto con acqua calda, siano sottoposti a tre attacchi di 24 ore a 60 °C o 85 °C.

Tuttavia il problema della preparazione di una direttiva comunitaria non risiede nei problemi tecnici da risolvere, quanto nella volontà o nella possibilità della Commissione di operare anche in questo settore e nella scelta dell'ambito regolamentare in cui operare. In un importante convegno che si è tenuto a Vienna nel marzo 1994 ed in cui si è dibattuto il problema delle regole da fissare per i materiali a contatto dell'acqua potabile si è pervenuti alle seguenti conclusioni:

- ⇒ con poche eccezioni, tutti hanno riconosciuto l'importanza di una standardizzazione europea del settore sia per il raggiungimento del mercato interno sia ai fini degli appalti pubblici;
- ⇒ tutti hanno riconosciuto la difficoltà che il CEN possa pervenire ad una norma europea, dato che si tratta di stabilire degli standard sanitari per i quali mancano a livello di CEN competenze e procedure adeguate;
- ⇒ tutti ritengono che il riconoscimento reciproco delle regole nazionali previsto dalle regole nazionali previsto dall'art. 30 non è sufficiente per risolvere i problemi commerciali del settore;
- ⇒ tutti si sono rivolti alla Commissione perché prenda una iniziativa di armonizzazione del settore.

Ed allora perché non si agisce a livello comunitario? Il fatto è che in questo momento la Commissione non ha le strutture sufficienti per agire contemporaneamente su tutti i campi su cui è chiamata ad operare. Il sottoscritto, pur ritenendo che la materia non debba essere delegata al CEN per l'evidente importanza che assumono nella problematica in questione gli aspetti sanitari, è quanto mai restio ad iniziare i lavori per l'impossibilità pratica a far fronte ai molteplici impegni che l'armonizzazione del settore dei materiali a contatto degli alimenti già di per sé pone. L'estensione della direttiva sulle materie plastiche ai materiali per l'acqua potabile, infatti, implicherebbe la valutazione di altre centinaia di sostanze in un momento in cui il Comitato Scientifico

dell'Alimentazione umana è impegnato ad esaminare centinaia di dossiers tossicologici che richiedono con le attuali strutture e metodi di lavoro circa 4 anni di lavoro per smaltire gli arretrati.

D'altra parte non è detto che lo schema attuale di regolamentazione per i materiali a contatto degli alimenti possa essere accettato facilmente dagli esperti governativi, come si potrebbe credere. Infatti, se spesso a livello regolamentare si fa riferimento alla direttiva sulle materie plastiche per alimenti, in alcuni paesi esistono delle normative o delle raccomandazioni autonome non sempre in linea con le direttive comunitarie.

Nei Paesi Bassi, ad esempio, invece di una lista unica valevole per tutti i materiali plastici vi sono delle liste positive per alcuni tipi di materie plastiche (PVC, PP, PE, ecc.) ed i valori di migrazioni specifici stabiliti per le materie plastiche a contatto degli alimenti sono divise per un fattore venti, per tener conto delle convenzioni proprie alla contaminazione dell'acqua potabile stabilite a livello internazionale, per cui solo il 10% della DGA può essere utilizzata per stabilire un valore limite di contaminazione (e non il 100% come nella regolamentazione per i materiali a contatto degli alimenti). Nel Regno Unito invece, la conformità di un prodotto è stabilita da un Comitato ad hoc che giudica caso per caso il materiale finito. In Germania esistono delle liste positive analoghe a quelle degli olandesi anche se le restrizioni sono espresse piuttosto in termini di quantità massime nel prodotto finito che in quantità massima di sostanza cedibile. Quindi, vi sono approcci diversi nelle regolamentazioni ed un tentativo di armonizzare intrapreso da un gruppo ad hoc del CEN ha fallito per gli evidenti contrasti esistenti a livello nazionale.

Una soluzione al problema potrà avvenire solo se la Commissione si deciderà ad agire. Ma anche in questo caso vi sono delle difficoltà perché non è chiaro se la materia debba essere regolamentata nell'ambito della direttiva acque potabili o infine nell'ambito della direttiva materiali da costruzione. Un'ipotesi possibile ed abbastanza verosimile è che la cessione dei materiali di tipo metallico o inorganico sia regolamentata nell'ambito della direttiva acque potabili che già prevede limiti per il piombo e per altri metalli. Mentre la cessione delle sostanze organiche provenienti dalle materie plastiche o dalle gomme è esaminata nell'ambito del quadro legislativo relativo ai materiali a contatto degli alimenti.

ALLEGATO 1

PRINCIPALI DIRETTIVE GIA' ADOTTATE NEL SETTORE DEGLI IMBALLAGGI PER ALIMENTI

Direttive applicabili a tutti i materiali

Nuova Direttiva quadro	89/109/CEE
Simbolo	80/590/CEE

Direttive applicabili a singoli materiali**Plastiche:**

Direttiva di base	90/128/CEE
1a modifica alla direttiva di base	92/39/CEE
2a modifica alla direttiva di base	93/ 9/CEE
3a modifica alla direttiva di base	95/3/EC
Direttiva sulle regole di base per le prove di migrazione	82/711/CEE
1a modifica alla direttiva "regole di base"	82/711/CEE
Direttiva sull'elenco dei simulanti	85/572/CEE
Direttiva sul cloruro di vinile monomero (VCM)	78/142/CEE
Direttiva sul metodo per determinare il VCM nel PVC	80/766/CEE
Direttiva sul metodo per determinare il VCM negli alimenti	82/432/CEE

Pellicole di cellulosa rigenerata (RCF):

Direttiva di base	93/10/CEE
-------------------	-----------

Ceramica:

Direttiva di base	84/500/CEE
-------------------	------------

Direttive applicabili a singole sostanze

Cloruro di vinile	78/142/CEE
Metodo per determinare il CV nel PVC	80/766/CEE
Metodo per determinare il CV negli alimenti	82/766/CEE

MEG e DEG nella cellulosa rig. (Vedi sopra)

ALLEGATO 2

SIMULANTI GENERALI DA USARSI NELLE PROVE DI MIGRAZIONE

1. Acqua distillata o equivalente.
2. Acido acetico al 3% in soluzione acquosa.
3. Etanolo al 15% in soluzione acquosa.
4. Olio di oliva rettificato.

Se per motivi tecnici (che debbono essere spiegati) connessi con il metodo di analisi è necessario utilizzare altri simulanti, l'olio di oliva deve essere sostituito da una miscela di trigliceridi sintetici o dall'olio di girasole.

ALLEGATO 3

PROVE DI MIGRAZIONE PER LE MATERIE PLASTICHE

Condizioni di contatto nell'impiego reale (T=temperatura)	Condizioni di prova
1. <u>Tempo di contatto: più di 24 ore</u>	
1.1 T eguale o inferiore a 5°C	10 giorni a 5°C
1.2 T superiore a 5°C ma non a 20°C (etichettatura obbligatoria)	10 giorni a 20°C
1.3 T superiore a 5°C ma non a 40°C	10 giorni a 40°C
2. <u>Tempo di contatto: tra 2 e 24 ore</u>	
2.1 T eguale o inferiore a 5°C	24 ore a 5°C
2.2 T superiore a 5°C ma non a 40°C	24 ore a 40°C
2.3 T superiore a 40°C	in conformità con le leggi nazionali
3. <u>Tempo di contatto: inferiore a 2 ore</u>	
3.1 T eguale o inferiore a 5°C	2 ore a 5°C
3.2 T superiore a 5°C ma non a 40°C	2 ore a 40°C
3.3 T superiore a 40°C ma non a 70°C	2 ore a 70°C
3.4 T superiore a 70°C ma non a 100°C	1 ora a 100°C
3.5 T superiore a 100°C ma non a 121°C	30 min a 121°C *
3.6 T superiore a 121 °C	in conformità con le leggi nazionali

* questa prova è eseguita solo con l'olio d'oliva o uno dei suoi sostituti.

ALLEGATO 4

ESEMPI PRESI DALLA DIRETTIVA SULL'ELENCO SPECIFICO DEI SIMULANTI

Alimento	Acqua	Acido acetico 3%	Etanolo 15%	Olio di oliva
Bevande non alcoliche	X	X	-	-
Cioccolato, prodotti rivestiti di cioccolato.	-	-	-	X/5
Pesce. Fresco, refrigerato, salato, affumicato.	X	-	-	X
Animali e oli vegetali	-	-	-	-
Aceto	-	X	-	-
Patate fritte	-	-	-	X/5

N.B. La prova deve essere eseguita solo con il simulante indicato con la x. Laddove compare X/3 o X/5. Il risultato della prova deve essere diviso per un numero appropriato, noto come "coefficiente di riduzione" che tiene conto in modo convenzionale del fatto che la capacità estrattiva dei simulanti degli alimenti grassi è più grande di quella di certi alimenti.

ASPETTI CRITICI DELLA CONTAMINAZIONE DELLE ACQUE POTABILI

Enzo Funari

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Il rischio posto dalla presenza di agenti chimici nelle acque potabili è in genere difficilmente riscontrabile attraverso l'indagine epidemiologica o altre osservazioni sull'uomo. Infatti raramente gli agenti chimici contaminanti raggiungono concentrazioni tali da rappresentare un rischio di tossicità acuta, a causa della forte diluizione alla quale sono soggetti, una volta immessi in un corpo idrico. Nel caso dei composti lipofili, inoltre, le concentrazioni nelle acque sono regolate anche dalla loro scarsa idrosolubilità.

Tuttavia, sono stati riportati alcuni episodi di intossicazione acuta, associati ad esposizione a fluoruri e a nitrati, negli Stati Uniti [1].

In generale, l'esposizione alle sostanze chimiche attraverso il consumo dell'acqua potabile è una esposizione a basse dosi per periodi prolungati. E' pertanto particolarmente complesso associare questo tipo di esposizione ad eventuali patologie nei consumatori.

Recentemente, Cantor [2] ha esaminato le evidenze disponibili sull'associazione tra contaminanti dell'acqua potabile e patologie nell'uomo, pervenendo alle seguenti conclusioni.

Le evidenze dagli studi epidemiologici finora disponibili sull'amianto non sono conclusive.

Il rischio associato alla presenza di radionuclidi nell'acqua destinata al consumo umano è contenuto rispetto ad altre fonti di esposizione; l'acqua potabile contribuisce mediamente soltanto per circa il 2% al radon totale nell'ambiente domestico.

L'esposizione all'arsenico attraverso l'acqua potabile causa il cancro nell'uomo in diversi siti, come è stato anche recentemente evidenziato da alcuni studi in Taiwan.

Sono sempre maggiori le evidenze di un'associazione tra esposizione ai sottoprodotti della clorazione, specialmente ai livelli trovati in molte acque superficiali clorate, e cancro della vescica, del retto e possibilmente del colon.

L'autore dello studio ha anche esaminato i possibili effetti di contaminanti delle acque potabili sulla prole, rilevando che è difficile trarre conclusioni dagli studi disponibili, per i limiti che questi presentano. Tuttavia, Cantor ha riportato alcuni casi nei quali sono state osservate associazioni tra consumo di acqua contaminata da cloroformio e altri solventi organoalogenati e malformazioni nella prole e ha indicato questo tipo di contaminazione tra i problemi prioritari da approfondire.

Infine, in relazione alle malattie infettive trasmesse attraverso il consumo di acqua potabile, l'autore ha segnalato la rilevanza di questo rischio, che fino a tempi

relativamente recenti si riteneva invece sotto controllo, grazie ai sistemi di trattamento delle acque grezze. Gravi episodi di gastroenteriti acute si sono verificate a causa della resistenza di virus e altri agenti microbiologici ai trattamenti con cloro.

Quest'ultimo tipo di rischio è tuttavia nella gran parte dei casi associato a difetti dei sistemi di trattamento delle acque grezze. In un'indagine condotta negli Stati Uniti nel 1991-92, sono stati riportati 32 epidemie associate a contaminazioni microbiologiche che hanno dato luogo a gastroenteriti acute [1].

Attività dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)

Nonostante la limitazione delle informazioni dirette sui possibili effetti delle sostanze chimiche sulla salute dell'uomo, per molte di esse, il rischio può essere stimato attraverso procedure quali quelle applicate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità [3]. Attraverso queste procedure vengono definite le concentrazioni fino alle quali il consumo dell'acqua potabile non rappresenta un rischio significativo per la salute dei consumatori e/o quelle alle quali corrisponde un determinato rischio di cancro (quest'ultimo caso riguarda le sostanze classificate come cancerogene genotossiche).

Le normative nazionali di moltissimi paesi sono basate sulle linee guida dell'OMS e in buona parte è ragionevole supporre che lo sarà anche la nuova Direttiva UE sulle acque destinate al consumo umano, attualmente in corso di discussione.

In modo molto sintetico, le linee guida dell'OMS derivano in massima parte dagli studi condotti sugli animali, i cui risultati vengono estrapolati all'uomo attraverso l'applicazione di fattori di sicurezza o di incertezza. In sostanza, le procedure dell'OMS vengono generalmente applicate anche da altre organizzazioni internazionali e agenzie nazionali e trovano ampio consenso nel mondo scientifico. Due principali osservazioni vengono tuttavia avanzate rispetto a queste procedure. La prima riguarda i metodi applicati per la stima del rischio cancerogeno, che sarebbero necessariamente approssimativi riflettendo tutte le incertezze scientifiche ancora esistenti nella comprensione del processo della cancerogenesi. La seconda è una osservazione ovvia che riguarda il fatto che dai risultati della sperimentazione animale non possono essere ricavate informazioni su possibili patologie minori dell'uomo, quali emicranie, stato di malessere generale, ecc.

Questa importantissima attività dell'OMS è in continua evoluzione per quanto riguarda il miglioramento sia delle procedure applicate che la qualità delle informazioni disponibili. La scelta fatta recentemente inoltre di aggiornare continuamente le linee guida sugli agenti microbiologici e chimici ritenuti volta per volta di interesse prioritario è del tutto opportuna e condivisibile.

Nella riunione del Comitato di coordinamento per l'aggiornamento delle linee guida dell'OMS, tenuta a Ginevra a dicembre del 1995, sono stati individuati gli agenti chimici e microbiologici di prima priorità, per i quali saranno definite le linee guida nella prima fase di questa nuova attività e quelli da esaminare in una seconda fase. Tra gli agenti selezionati per una valutazione nella prima fase, di particolare interesse sono le tossine

che si formano dai cianobatteri, che possono rappresentare un problema sanitario significativo per gli approvvigionamenti idropotabili soggetti a fenomeni di eutrofizzazione. Tra gli agenti che sono stati segnalati per una valutazione da effettuare in una seconda fase, sembra opportuno segnalare i prodotti di degradazione dei pesticidi e gli xeno-ormoni. Il problema posto dai primi è che potrebbero essere presenti nelle acque potabili, anche insieme ai composti dai quali derivano [4]. Quelli dotati di attività biologiche significative dovrebbero dunque essere considerati quando si definiscono le linee guida dei pesticidi dai quali derivano. Gli xeno-ormoni sono attualmente oggetto di numerosi studi, per approfondire le conoscenze sui loro possibili effetti cancerogeni e sulla riproduzione nell'uomo, segnalati in alcuni studi [5,6].

Nella riunione sopra menzionata, l'OMS ha deciso di avviare per la prima volta, nell'ambito delle attività per la definizione delle linee guida per la qualità delle acque potabili, un'importante attività di gestione del rischio, con lo scopo di fornire indicazioni per la riduzione del rischio associato al consumo delle acque potabili. Questa attività, affiancata a quella di valutazione del rischio, sopra accennata, è molto utile. Infatti, in un certo senso, il miglioramento delle procedure e della qualità delle informazioni che permettono una sempre più corretta valutazione del rischio sembra condurre ad una sorta di accanimento accademico, ad un esercizio che rischia di essere avulso dalla realtà. E' necessario invece, oltre a svolgere questa attività, intervenire sui problemi sanitari prioritari associati alla qualità delle acque utilizzate per scopo potabile, indicando le misure concrete per la riduzione del rischio. Si spera che si arrivi presto ad affiancare ai valori di linea guida, dove possibile, le condizioni attraverso le quali questi valori possono essere raggiunti.

Nel caso dei sottoprodotti della clorazione, questi sono stati oggetto di numerosi studi, finalizzati a valutare la natura e l'entità del rischio cancerogeno per l'uomo [2,7-11]. Da un lato è corretto approfondire gli studi sull'associazione tra esposizione ai sottoprodotti della clorazione e insorgenza di tumori ad essa associata. Infatti si tratta di un problema assai delicato perché anche se il rischio sembra essere piuttosto contenuto, la popolazione esposta a queste sostanze è tuttavia particolarmente numerosa, coincidendo sostanzialmente con quella inclusa nelle aree approvvigionate con acque superficiali. Il problema è delicato anche per il fatto che i processi di potabilizzazione, responsabili della formazione dei sottoprodotti menzionati, sono necessari per prevenire il rischio di esposizioni ad agenti microbiologici patogeni. Tuttavia, è anche importante ricordare che gli studi disponibili si riferiscono ad esposizioni avvenute nel passato. In molti casi, specialmente in Italia, dove è entrato in vigore dal 1991 il limite di 30 $\mu\text{g/l}$ per il parametro 32 (composti organoalogenati), i livelli di esposizione sono sensibilmente ridotti. Inoltre, in genere è radicalmente cambiata la tipologia dei trattamenti. In Italia, mentre è difficile essere a conoscenza di eventuali cambiamenti nei numerosissimi acquedotti che servono piccole comunità, in molti casi nei grandi acquedotti, risulta che il biossido di cloro abbia sostituito il cloro gassoso o l'ipoclorito. Viene fatto inoltre un notevole impiego di ozono. In conclusione, il problema dell'esposizione ai sottoprodotti dei processi di disinfezione delle acque sembra procedere verso una riduzione dei possibili effetti sulla salute dei consumatori. Rimangono tuttavia alcuni aspetti da

approfondire, quali i possibili effetti sulla salute dell'uomo associati alla presenza dei sottoprodotti che si formano a seguito dell'uso di agenti alternativi al cloro gassoso o all'ipoclorito [12]. Nonostante ciò è possibile indicare alcune linee guida per minimizzare la presenza dei sottoprodotti dovuti ai trattamenti di disinfezione.

Alcuni limiti della normativa nazionale e comunitaria

Ovviamente i limiti della Direttiva CEE 778/80 sulla qualità delle acque destinate al consumo umano sono sempre più vistosi man mano che ci si allontana dal periodo della sua elaborazione, che risale alla seconda metà degli anni settanta.

Uno dei limiti principali della Direttiva è quello di non aver stabilito specifiche CMA per molte sostanze chimiche, che si trovano spesso raggruppate in categorie comunque eterogenee con il nome di parametri. Altro limite evidente è quello di non aver stabilito CMA per i composti organoalogenati. Altri limiti ancora potrebbero essere citati, ma due di questi hanno necessariamente bisogno di essere corretti. Il primo riguarda le CMA per le sostanze naturalmente presenti negli approvvigionamenti idropotabili, che a parere dell'autore di questo contributo dovrebbero coincidere con le linee guida dell'OMS. Paradossalmente, per abbattere la presenza di ammoniaca in alcuni approvvigionamenti idropotabili di grande importanza nel nostro paese, al fine di rispettare la CMA della CEE inutilmente restrittiva da un punto di vista sanitario, sono stati effettuati dei trattamenti di clorazione che hanno costretto i consumatori ad usare un'acqua con elevatissimi livelli dei sottoprodotti della clorazione, sopra menzionati.

Altro limite serio della normativa comunitaria e nazionale è che non vengono considerati i casi di esposizione per periodi limitati. In situazioni di emergenza, ad esempio, invece di interrompere l'erogazione di acqua se una CMA viene momentaneamente superata, si dovrebbe valutare se non sia conveniente continuare la distribuzione. Tale distribuzione potrebbe essere consentita se la concentrazione del parametro in esame non supera i valori di sicurezza sanitari, che possono essere stabiliti con le procedure attualmente applicate dall'USEPA [13], che definisce per un ampio numero di sostanze chimiche le concentrazioni che possono essere accettate per esposizioni rispettivamente fino a 5 e 14 giorni, nonché fino a circa 7 anni. Bisognerebbe anzi indirizzare verso questo tipo di scelta ogni volta che l'interruzione della distribuzione dell'acqua, comportando una depressione nel sistema di distribuzione, può causare infiltrazioni di acque contaminate nella rete di distribuzione, senza considerare i seri problemi igienico-sanitari che possono scaturire da una situazione di carenza idrica.

La nuova proposta di Direttiva [14], così com'è attualmente concepita, affronta soltanto alcuni di questi problemi.

I problemi che dovrebbero essere considerati ai fini del miglioramento della qualità delle acque potabili in Italia sono stati affrontati recentemente dall'autore di questo contributo in un rapporto Istisan [15].

BIBLIOGRAFIA

1. MOORE, A.C., HERBWALDT, B.L., CRANN, G.F., CALDERON, R.L., HIGTSMITH, A.K., JURANEK, D.D. Waterborne disease in the United States, 1991 and 1992. *J. AWWA* 1994, 86: 87-99.
2. CANTOR, K. Epidemiologic research priorities on the health risk of drinking water contaminants. In: *Environmental Epidemiology, Exposure and Disease*. R. Bertollini, M.D. Lebowitz, R. Saracci, D.A. Savitz (Eds). CRC-Lewis Publishers, Boca Raton - New York - London - Tokyo 1995.
3. WHO, 1993. *Guidelines for drinking-water quality, second edition, Volume 1, Recommendations*, World Health Organization 1993, Geneva, Switzerland.
4. FUNARI, E., DONATI, L., SANDRONI, D., AND VIGHI, M. *Pesticide Levels in Groundwater: Value and Limitations of Monitoring*. In: *Pesticide Risk in Groundwater*. M. Vighi and E. Funari (Eds). CRC Lewis Publishers, Boca Raton - New York - London - Tokyo. p. 3-44
5. COLBORN, T., 1995. Environmental estrogens: health implications for humans and wildlife. *Environm. Health Perspect.* 1995, 103:135-136.
6. CARLSEN, E., GIWERCMAN, A., KEIDING, N. AND SKAKKEBAEK N.E 1995. Declining Semen Quality and Increasing Incidence of Testicular Cancer: Is there a Common Cause? *Environ. Health Perspect.* 103 (7):137-139
7. MORRIS, R.D., AUDET, A.M., ANGELILLO, I.F., CHALMERS, C.T., MOSTELLER, F. Chlorination, Chlorination By-products, and Cancer: A Meta-analysis. *Am. J. Publ. Health* 1992, 82(7):955-963.
8. ZIERLER, S., FEINGOLD, L., DANLEY, R.A., CRAUN, G. Bladder Cancer in Massachusetts Related to Chlorinated and Chloraminated Drinking Water: A Case-Control Study. *Arch. Environ. Health* 1988, 43(2):195-200.
9. MORRIS, R.D. Drinking Water and Cancer. *Eniron. Health Persp.* 1995, 103(8): 225-232.
10. KOIVUSALO, M.T., JOUNI, J.K., JAAKKOLA, J.K., and VARTIAINEN, T. Drinking Water Mutagenicity in Past Exposure Assessment of the Studies on Drinking Water and Cancer: Application and Evaluation in Finland. *Environ. Res.* 1994, 64:90-101.
11. KOIVUSALO, M.T., JOUNI, J.K., JAAKKOLA, J.K., and VARTIAINEN, T. Drinking Water Mutagenicity and Gastrointestinal and Urinary Tract Cancers: An Ecological Study in Finland. *Am. J. Publ. Health* 1994, 84(8):1223-1228.
12. BULL, R.J., LINDA, S., BIRNBAUM, KENNETH, P., CANTOR, J., ROSE, B., BYRON, E., BUTTERWORTH, R.P., AND J. TUOMISTO 1995. Symposium overview. Water chlorination: essential process or cancer hazard?. *Fund. Appl. Toxicol.* 28:155-166.
13. USEPA, 1994. Drinking water regulations and health advisories by Office of Water U.S. Environmental Protection Agency Washington, D.C. 202-260-7571
14. Proposta di Direttiva del Consiglio relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee N. C 131/6 del 30-7-1995.
15. FUNARI, E. 1995. Stato di qualità delle acque potabili in Italia in relazione alle linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e alla normativa comunitaria e nazionale. Roma, Istituto Superiore di Sanità (Rapporti Istisan, 95/24), 76 p.

CANCEROGENI NELLE ACQUE

Romano Zito

Istituto di Ricerca Regina Elena, Roma

La valutazione del rischio cancerogeno dei più diffusi contaminanti delle acque potabili è più difficile di quella legata a miscele variabili di cancerogeni. Alle incertezze della misura dell'esposizione si aggiunge per molti dei contaminanti, la natura chimica che rende complicata anche la determinazione sperimentale della cancerogenicità.

Una parte considerevole dei contaminanti cancerogeni delle acque appartiene infatti agli alogeno derivati (bromo e cloro) alifatici. Alcuni provengono dall'infiltrazione nelle falde di solventi industriali e molti sono derivati clorurati del metano, principali prodotti della clorazione delle acque. Sono specialmente i composti alogenati con un solo atomo di carbonio per i quali è difficile chiarire il meccanismo della cancerogenesi, attualmente indispensabile per stabilire correttamente delle stime di rischio.

Il problema cruciale della valutazione del rischio cancerogeno da sostanze chimiche è il tipo di meccanismo della cancerogenesi: genotossico o epigenetico. Nel primo caso infatti si ipotizza l'assenza di soglia, con la conseguente fissazione di livelli di esposizione che corrispondano ad un "rischio accettabile", ma ineliminabile. Nel secondo caso invece i fenomeni indiretti alla base della trasformazione neoplastica avvengono a partire da un certo livello di esposizione e si può quindi determinare una dose di soglia, al di sotto della quale il rischio cancerogeno sia zero.

Oltre le classiche prove di cancerogenesi nei roditori hanno sempre più importanza le prove di mutagenesi, o, più correttamente, a breve termine, proprio perchè sono utilissime per precisare il meccanismo della cancerogenesi.

Fra le prove a breve termine un particolare valore ha acquistato negli ultimi anni la determinazione degli addotti sul DNA del cancerogeno somministrato *in vivo* che permette di ottenere buoni dati quantitativi per intervalli molto grandi di dosi, anche di centomila volte.

La costanza del rapporto tra molecole somministrate ed addotti sul DNA è stato dimostrato *in vivo* per aflatoxina [1], benzopirene [2], safrolo [3], acetilamminofluorene [4,5], 2,4, diamminotoluene [6], ciclopentapirene [7]:

La maggior parte dei lavori è stata eseguita sul fegato, ma tutti gli altri organi osservati hanno mostrato lo stesso andamento lineare del rapporto dose/addotti. Lo stesso andamento lineare dose/addotti è stato osservato nel DNA dei globuli bianchi di uomini esposti professionalmente a stirene. L'intervallo di dose era, ovviamente, molto più piccolo (200 volte), ma si è osservata una buona linearità [8]. In tutte queste determinazioni sono inclusi tutti gli effetti dell'attivazione metabolica, della farmacocinetica, della coniugazione e della riparazione del DNA.

Dato che esiste un rapporto abbastanza lineare tra numero di addotti e numero di cellule trasformate [9] o numero di tumori in vivo [4] si può ipotizzare la mancanza di soglia per i cancerogeni genotossici.

Il risultato più importante di tutti questi esperimenti è la conferma della validità dell'estrapolazione dalle alte dosi dell'esperimento animale alle basse dosi dell'esposizione umana, dimostrata per gli addotti, e quindi molto probabile per il numero dei tumori.

Il legame in vivo di un cancerogeno con il DNA è quindi considerato attualmente la prova più sicura del meccanismo genotossico della cancerogenesi, ed è infatti il punto cruciale nelle discussioni fra ricerca industriale e autorità sanitarie.

Il metodo più semplice e diffuso per misurare il legame con il DNA consiste nella somministrazione all'animale del cancerogeno marcato nelle strutture stabili della molecola, in genere con ^{14}C .

Dopo isolamento e purificazione, gli addotti al DNA dell'organo o del tessuto vengono determinati misurando la radioattività del campione. Questa tecnica semplice e sensibile non può però essere adoperata per tutti i composti che contengano un solo atomo di carbonio nella molecola, quali sono buona parte dei contaminanti dell'acqua.

La biosintesi delle nucleobasi attinge infatti atomi di carbonio dall'"one carbon pool". In questo modo si ha una incorporazione nelle nucleobasi dell'atomo di C radioattivo ad un livello che può essere anche centinaia di volte superiore al numero di molecole di cancerogeno legate al DNA come addotti. Quindi questi risultano non determinabili per la diffusa ed elevata radioattività di fondo del DNA, dovuta all'incorporazione nelle nucleobasi dell'atomo di carbonio del cancerogeno marcato.

Le altre due tecniche di determinazione degli addotti sul DNA, l'immunochimica e il postlabelling sono di difficile applicazione per le piccole dimensioni di questi cancerogeni, non sufficientemente immunogeni e le cui proprietà cromatografiche sono poco differenti da quelle delle corrispondenti basi non modificate.

I derivati alogenati del carbonio presentano poi nel legame con il DNA un comportamento che complica ulteriormente lo studio del loro meccanismo di azione. Gli atomi di alogeno, altamente elettronegativi e reattivi possono determinare una rapida scissione del legame cancerogeno-DNA, anche per reazione con l'acqua. Il rapporto fra addotti e tumori, stabilmente quantificabile per i grandi addotti aromatici come il benzopirene, la cui semivita sul DNA è di settimane, non è valutabile per gli alogenoderivati alifatici di piccole dimensioni molecolari.

La natura chimica degli alogeno derivati alifatici determina poi, attraverso la formazione di intermedi reattivi con il glutatione delle rotture del DNA, che complicano ulteriormente i danni genotossici di queste sostanze, come è stato dimostrato per il diclorometano [10].

Negli esperimenti di cancerogenesi sono spesso presenti effetti citotossici, talora così intensi da indurre necrosi. Occorre infatti che il numero relativamente piccolo degli animali venga compensato dall'uso di dosi molto alte per ottenere un numero di tumori statisticamente significativo. Sui rapporti fra proliferazione cellulare indotta da fenomeni tossici e sviluppo dei tumori, è in corso da qualche anno una vivace polemica.

L'argomento cruciale è la possibilità che le mutazioni spontanee per errori di replicazione siano più facilmente fissate aumentando il numero delle divisioni cellulari. In questo modo la semplice citotossicità, stimolando la proliferazione rigenerativa determinerebbe l'insorgenza di tumori che non si avrebbe alle dosi più basse, non citotossiche [11], la cancerogenicità sperimentale sarebbe quindi un artefatto dovuto alle alte dosi [12].

La frequenza delle mutazioni spontanee è troppo bassa per determinare lo sviluppo di tumori dovuto alla sola proliferazione cellulare [13] e numerosi epiteli in cui è stata indotta una vivace attività proliferativa proseguita per anni non hanno mai dato tumori [14]. Inoltre una proliferazione intensa, quale si riscontra normalmente nella cornea e nell'intestino tenue, può addirittura inibire lo sviluppo di tumori [15].

In conclusione, senza un danno al DNA, la sola proliferazione non sembra sufficiente a provocare la cancerogenesi [16,17].

Il problema del rischio delle miscele di cancerogeni, che aggiunge un considerevole fattore di incertezza, è sempre presente nelle acque. Tuttavia il poco che si sa sulla "combination carcinogenesis" come viene definita l'azione contemporanea di due o più cancerogeni, è abbastanza rassicurante. Sono ovviamente pochissimi gli esperimenti di cancerogenesi con due cancerogeni, e non ne esistono con più di due [18], e vi sono alcuni buoni dati epidemiologici. Dai dati si possono finora trarre due conclusioni: quando i cancerogeni appartengono alla stessa famiglia chimica gli effetti sinergici sono solo additivi. Per cancerogeni chimicamente diversi si possono ma non sempre, osservare effetti sinergici moltiplicativi, i quali finora non superano un ordine di grandezza. Poiché i cancerogeni di solito presenti nelle acque appartengono alla stessa famiglia chimica degli alogenoderivati alifatici una valutazione del rischio cancerogeno basata su un sinergismo additivo è sufficiente base per le misure regolative.

In questo istituto è stato studiato esaurientemente il metabolismo di uno dei maggior contaminanti delle acque, il cloroformio, che viene qui presentato come esempio dei problemi che sottendono la valutazione della cancerogenicità di questi composti. Il cloroformio viene metabolizzato, in proporzioni variabili fra le varie specie e ceppi, sia ossidativamente, con formazione di HCl e fosgene, sia riduttivamente con formazione di radicali clorometilici [19,20].

Sia il fosgene che quest'ultimo sono in grado di reagire con il DNA nucleare, anche se è più probabile la reazione con il DNA mitocondriale. In entrambi i casi gli addotti sono molto instabili. Gli esperimenti di cancerogenesi hanno mostrato tumori epatici nei topi, e tumori renali nei ratti maschi. Gli effetti citotossici e la conseguente proliferazione cellulare negli organi bersaglio, non sempre coincidenti con l'induzione di tumori, non sembrano sufficienti da soli a spiegare la cancerogenesi, mentre potrebbero aumentare la probabilità di stabilizzare il danno al DNA, malgrado la labilità degli addotti [21].

Le conclusioni che si possono trarre da questa esposizione di incertezze e complessità, insieme ai dati epidemiologici esposti altrove, sono tuttavia ben fondate.

E' opportuno abbandonare ogni tentativo di distinguere, berinteso solo ai fini regolativi, fra cancerogeni genotossici ed epigenetici. Gli ultimi anni di ricerca sui meccanismi della cancerogenesi, anziché dimostrare una cancerogenesi epigenetica,

l'hanno resa improbabile, tanto che non pochi ricercatori dubitano della sua stessa esistenza.

Considerando tutti i contaminanti delle acque come cancerogeni genotossici, occorre però includere nelle valutazioni del rischio tutti quegli elementi che, come nell'esempio del cloroformio, possono determinare variazioni anche grandissime della potenza cancerogena.

L'entità del rischio accettabile è invece una decisione che dipende dalla comparazione con rischi sanitari di natura diversa, e che richiede altre competenze, oltre quelle tossicologiche ed oncologiche.

BIBLIOGRAFIA

1. APPLETON, B.S. et al. *Cancer Res.* 1982, 42: 3659-3662.
2. DUNN, B.P. *Cancer Res.* 1983, 43: 2654-2658
3. GUPTA, P.K. et al. *Carcinogenesis* 1993, 14: 1517-1521
4. BELAND, F.A. et al. In: "Mouse Liver Carcinogenesis" ALAN LISS 1990, 121-129
5. NANG CHOY, W. *Mutat. Res.* 1993, 296: 181-198
6. LA, D.K., FROINES, J.R. *Chem. Biol. Interac.* 1992, 83: 121-134
7. BEACH, A.C., GUPTA, R.C. *Carcinogenesis* 1994, 15: 1065-1072
8. HORVATH, E. et al. *Carcinogenesis* 1994, 15: 1309-1315
9. THEALL, E. et al. in: Banbury Report 13 "Indicators of Genotoxic Exposure"
10. BRIDGES, B.A. et al. Editori, Cold Spring Harbor, 231-240
11. GRAVES, R.J., COUTTS, C., GREEN, T. *Carcinogenesis* 1995, 16:
12. COHEN, S.M., ELLEWEIN, L.B. *Science* 1991, 249: 1007-1011
13. AMES, B.N., GOLD, L.S. *Science* 1990, 249: 970-971
14. WEINSTEIN, I.B. *Science* 1991, 251: 387
15. ZITO, R. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 1992, 11: 3-6
16. FARBER, E.. *Cancer Res.* 1995, 55: 3759-3762
17. WARD, J.M. et al. *Environ. Health Perspect.* 1993, 101(5):
18. HUFF, J. *Am. J. Ind. Med.* 1995, 27: 293-300
19. SCHMAHL, D. (1988) COMBINATION EFFECTS IN CHEMICAL CARCINOGENESIS VCH
Basel
20. TESTAI, E. et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992, 114: 197-203
21. TESTAI, E. et al. *Arch. Toxicol.* 1995, 70: 83-88

ASSOCIAZIONE TRA TUMORE DELLA VESCICA ED ESPOSIZIONE AD ARSENICO ATTRAVERSO L'ACQUA POTABILE: EVIDENZE DISPONIBILI

Ivano Iavarone⁽¹⁾, Roberta Pirastu⁽²⁾, Pietro Comba⁽¹⁾

⁽¹⁾ *Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

⁽²⁾ *Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo, Università degli Studi La Sapienza, Roma*

Introduzione

L'obiettivo di questo contributo è di valutare, attraverso una revisione della letteratura scientifica, la consistenza delle evidenze disponibili sull'associazione tra esposizione ad arsenico attraverso l'ingestione di acqua potabile e il rischio di tumore della vescica.

L'arsenico è un elemento chimico ubiquitario ed i suoi movimenti nell'ambiente avvengono principalmente ad opera dell'acqua [1]. Nel suolo esso raggiunge concentrazioni raramente superiori a 10µg/g [2], ed è associato essenzialmente a rocce ignee e sedimentarie nella forma di composti inorganici [3]. Le emissioni di arsenico nell'atmosfera derivano da processi naturali (vulcanismo, incendi naturali di zone boschive, etc.) ed antropogenici (combustione di carbone, processi industriali di fusione del rame, estrazione e lavorazione di metalli non ferrosi, agricoltura, etc.) in un rapporto di circa 60% a 40% rispettivamente [4]. La concentrazione di arsenico nelle acque dolci (fiumi e laghi) è in media dell'ordine di 1-2 µg/l [4] con una grande variabilità (fino a 70 µg/l) [5], determinata, oltre che dalla disponibilità di sedimento soggetto a co-trasporto e dall'intensità dell'evaporazione, anche da fattori quali l'inquinamento industriale e la contaminazione naturale e da erbicidi contenenti arsenico [3].

L'esposizione umana ad arsenico è di tipo sia occupazionale che ambientale. Tra le principali attività lavorative che comportano una elevata esposizione ad arsenico per inalazione vi sono: fusione e raffinazione di minerali del rame, oro e piombo, produzione e uso di pesticidi in agricoltura, produzione di pigmenti e coloranti a base di arsenico, manifattura del vetro, di semiconduttori e produzione di vari prodotti farmaceutici [1,6,7].

La fonte principale dell'esposizione a questo elemento, per la popolazione generale, è rappresentata dall'ingestione di acqua contenente alti livelli di arsenico inorganico [8], che si può trovare come arsenato [As (V)], la forma più tossica, o come arsenito [As (III)] [9]. L'esposizione ad arsenico tramite ingestione può inoltre essere dovuta all'uso di alcuni farmaci, come la soluzione di Fowler, ed al consumo di vino e cibo contaminato [10,11].

Un'elevata concentrazione di arsenico nelle falde acquifere, dovuta a fenomeni di inquinamento o contaminazione naturale, è stata riscontrata in diverse zone geografiche. Una regione di Taiwan è caratterizzata da elevate concentrazioni di arsenico inorganico

nell'acqua di pozzo comprese tra 100 e 1820 $\mu\text{g/l}$ [12]; in Finlandia alcune aree presentano punte fino a 2000 $\mu\text{g/l}$ [13]; in una regione dell'Alaska sono stati rilevati livelli medi di arsenico di 224 $\mu\text{g/l}$ [14]. In Giappone, l'inquinamento industriale da trisolfuro di arsenico ha determinato concentrazioni superiori a 1000 $\mu\text{g/l}$ [15]. Sono stati inoltre segnalati valori di 200-250 $\mu\text{g/l}$ in Argentina e concentrazioni di picco di 800-1000 $\mu\text{g/l}$ in Cile [16]. Per quello che riguarda l'Italia sono disponibili pochi dati sui livelli di arsenico nell'acqua potabile; recenti indagini in Veneto, nel Mediobrenta, mostrano, seppur sporadicamente, livelli superiori a 50 $\mu\text{g/l}$ [17]. Nel 1976, a Manfredonia, un incidente in uno stabilimento di produzione di ammoniaca, urea e fertilizzanti ha comportato una rilevante dispersione di arsenico nell'ambiente circostante, i cui effetti sanitari a lungo termine richiedono ulteriori studi [18].

L'assorbimento di arsenico si realizza principalmente nel tessuto polmonare e nel tratto gastrointestinale [19,20], mentre l'escrezione avviene in gran parte attraverso le urine [21]. L'accumulo di questo elemento si osserva soprattutto nel fegato, nel rene, nella pelle e nei polmoni [22-24]; la detossificazione dell'arsenico inorganico avviene attraverso un processo di metilazione con la formazione di monometilarsinato (MMA) e dimetilarsinato (DMA), che si legano meno ai tessuti e vengono eliminati più rapidamente delle forme inorganiche [21].

L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro [25] classifica l'arsenico e i suoi composti come cancerogeni certi per l'uomo (Gruppo 1) sulla base di una azione cancerogena sulla pelle per ingestione e sul polmone per inalazione. Una successiva pubblicazione [26] considera l'esposizione ad arsenico ed ai suoi composti, come sospetta nel causare tumori del fegato, del sistema ematopoietico, del tratto gastrointestinale e del rene. I risultati di alcuni studi epidemiologici, analizzati in questa rassegna, sembrano inoltre indicare che l'ingestione di composti arsenicali attraverso l'acqua potabile sia associata anche ad un aumento di rischio tumorale per la vescica ed altri organi interni.

Rassegna degli studi

Studi epidemiologici. - La Tabella 1 descrive le principali caratteristiche e i risultati degli studi epidemiologici analizzati in questa rassegna. Attualmente nessuna indagine epidemiologica relativa all'esposizione ad arsenico attraverso le acque potabili risulta essere stata pubblicata in Italia.

In uno studio geografico condotto a Taiwan nell'area endemica per malattia cardiovascolare periferica associata ad esposizione cronica ad arsenico [27,28], è stata evidenziata una relazione dose-risposta, per entrambi i sessi, tra i tassi di mortalità per tumore della vescica e le concentrazioni di arsenico nell'acqua potabile.

In una successiva analisi degli stessi dati [29] sono state valutate le differenze nel rischio oncogeno per diversi organi interni in relazione all'assunzione *lifetime* di 10 $\mu\text{g/Kg/giorno}$ di arsenico, calcolata in base alle concentrazioni misurate nelle acque

potabili dell'area in studio (10-1750 µg/l). Le stime per questa dose giornaliera sono di un aumento di rischio per tumore vescicale pari a 1.2×10^{-2} negli uomini e 1.7×10^{-2} nelle donne.

Sempre a Taiwan, uno studio di correlazione geografica tra i livelli di arsenico nell'acqua di pozzo ed il numero di decessi per tumori di diverse sedi anatomiche [30] ha evidenziato una correlazione significativa tra i tassi di mortalità per tumore della vescica in entrambi i sessi.

In aree del Cile e dell'Argentina con elevata esposizione ad arsenico attraverso l'acqua potabile, con livelli dell'ordine, rispettivamente di 800-1.000 µg/l (valori di punta) e di 200-250 µg/l. (valori medi), sono stati riportati significativi aumenti di rischio (OD = Odds Ratio) per tumore della vescica pari a 6.1 per gli uomini e 8.3 per le donne in Cile, e pari a 2.1 tra gli uomini e 1.8 tra le donne in Argentina [16].

Lo studio caso-controllo [31] eseguito nell'area di Taiwan endemica per patologia vascolare periferica, ha mostrato per il tumore della vescica un significativo aumento di rischio al crescere dell'indice di esposizione; per le categorie di durata di esposizione fino a 20 anni, 21-40 e più di 40 anni, l'OR è pari rispettivamente a 1,3, 1,9 e 4,0.

A partire da uno studio multicentrico statunitense sul tumore della vescica [32] è stato condotto uno studio caso-controllo nello stato dello Utah, caratterizzato dai più elevati livelli medi di arsenico nelle acque potabili (5µg/l, intervallo 0.50 -160 µg/l) [33]. Sono stati utilizzati sia un indice di esposizione cumulativa ad arsenico (indice 1), sia un indice corretto per la quantità totale di liquidi ingeriti (indice 2). I risultati non hanno evidenziato una relazione dose-risposta con entrambi gli indici per l'insieme dei soggetti; tra i fumatori, invece, l'indice 2 è risultato associato al rischio di tumore della vescica sempre con una relazione dose-risposta, che è statisticamente significativa per durata di esposizione di 10-19 anni prima della diagnosi.

Due studi di coorte hanno analizzato l'incidenza di tumori della vescica in relazione all'esposizione cronica ad arsenico nell'acqua [34,15].

Il primo studio [34] è stato condotto a Taiwan sui residenti nell'area endemica per la malattia vascolare periferica; i risultati hanno mostrato una relazione dose-risposta statisticamente significativa tra il livello di esposizione cumulativa ad arsenico e il rischio di tumore della vescica; inoltre, il rischio era 5 volte più elevato nei soggetti con malattia vascolare periferica rispetto agli individui sani.

Il secondo studio è stato realizzato in Giappone tra i residenti in un'area dove un'industria produttrice di trisolfuro di arsenico aveva contaminato con le acque reflue la falda acquifera [15]. Nel gruppo di soggetti esposti ad alti livelli di arsenico nelle acque (≥ 1000 µg/l) sono stati osservati 3 casi di tumore del tratto urinario rispetto a 0.1 attesi [(SMR=312 (SMR=Rapporto Standardizzato di Mortalità)]; le tre neoplasie erano dello stesso tipo istologico, due a localizzazione vescicale e una alla pelvi renale. Tra gli esposti a meno di 1000 µg/l di arsenico nessuno aveva sviluppato tumori dell'apparato urogenitale.

Studi di genotossicità. - Di tutte le sostanze che sono state definite come cancerogene certe per l'uomo l'arsenico è la sola per la quale gli studi condotti su animali non forniscano una adeguata evidenza di cancerogenicità [25].

Il meccanismo di induzione tumorale dell'arsenico non è ancora stato chiarito. Ciò che è ormai accertato, comunque, è che i composti inorganici di questo elemento sono incapaci di per se di causare mutazioni geniche in siti specifici [35-37], ma agiscono come potenti clastogeni, inducendo aberrazioni cromosomiche, aumento di SCE (Scambi tra Cromatidi Fratelli), ed amplificazione genica [21,38,39]; è stato inoltre osservato, in colture cellulari sia umane che di mammifero, che il post-trattamento con arsenico potenzia gli effetti genotossici causati da altri agenti mutageni, mentre il pre-trattamento li riduce [40].

Per questi motivi è stato proposto che l'arsenico espliciti la sua azione nella fase di promozione o in quella di progressione della cancerogenesi, ma non sia mai un iniziatore del processo oncogeno [41-43]. L'ipotesi che vede l'arsenico coinvolto nella fase di progressione della tumorigenesi spiegherebbe perché i modelli tradizionali a due stadi (iniziazione/promozione) forniscono inadeguate evidenze per la cancerogenicità di questo elemento nei roditori [44]. Inoltre, è stato mostrato che l'arsenico agirebbe nella fase tardiva del processo cancerogeno in persone professionalmente esposte a questa sostanza [43], e che faciliterebbe la progressione dalla fase benigna a quella maligna della tumorigenesi [45].

In uno studio condotto nel Nevada è stato osservato un aumento significativo di circa 2 volte nella frequenza di micronuclei nelle cellule esfoliative della vescica in individui esposti ad alte concentrazioni di arsenico nell'acqua potabile rispetto a soggetti di controllo. Tale frequenza era inoltre positivamente e significativamente associata alla concentrazione urinaria di arsenico e dei suoi metaboliti ($r = 0.33$, $p = 0.03$), indicando una relazione dose-risposta [46].

Una rassegna della letteratura scientifica pubblicata nel 1996 [42] ha analizzato le relazioni dose-risposta nei saggi di genotossicità dell'arsenico condotti su differenti sistemi cellulari di mammifero ed umani; le analisi effettuate sembrano fornire un'adeguata evidenza del fatto che l'arsenico induca indirettamente diversi tipi di danno genetico secondo relazioni dose-risposta di tipo sublineare (presenza di un livello soglia), con l'eccezione degli SCE, per i quali sembrerebbe esistere una relazione di tipo lineare o sovralineare. Gli stessi autori riportano, inoltre, a sostegno dell'ipotesi di sublinearità, il fatto che a basse dosi l'arsenico esplica un'azione protettiva nelle cellule trattate rispetto a colture cellulari di controllo (aumento della sopravvivenza cellulare).

E' stato ipotizzato che un meccanismo di saturazione nel processo di metilazione dell'arsenico inorganico possa spiegare l'esistenza di un livello di soglia per gli effetti cancerogeni dovuti all'ingestione di questo elemento [21,47]. Un recente studio [48], sulla base dei dati disponibili sulla metilazione dell'arsenico nell'uomo, riporta però l'assenza di evidenza per un meccanismo di questo tipo in quanto anche a bassi livelli di esposizione il processo di metilazione è lontano dall'essere completo.

Discussione

E' importante sottolineare che la maggior parte degli studi epidemiologici qui considerati sono stati condotti nelle aree geografiche di Taiwan che sono caratterizzate da alte concentrazioni di arsenico nell'acqua potabile tali da determinare una situazione endemica per malattia cardiovascolare periferica. Questa circostanza rende problematica la scelta di un modello appropriato della relazione dose-risposta che consenta di estrapolare corrette stime di rischio associate a bassi livelli di esposizione.

Per quello che riguarda gli studi descrittivi, le popolazioni dello studio di correlazione geografica realizzato in Taiwan [30] si differenziano essenzialmente per i livelli di esposizione ad arsenico attraverso l'acqua potabile e l'analisi tiene conto di fattori quali l'industrializzazione e l'urbanizzazione; pertanto i risultati possono essere considerati complessivamente validi. Gli altri due studi ecologici [16] mostrano un significativo aumento di rischio per tumore della vescica, aumento che però potrebbe essere attribuibile a fenomeni di confondimento.

Una disamina degli studi caso-controllo e di coorte condotti a Taiwan permette di considerare improbabile l'esistenza di errori sistematici nella selezione dei soggetti e/o nella raccolta dell'informazione per la documentata completezza di raccolta e di registrazione dei dati medici in questo paese [10]. La forza dell'associazione tra tumore della vescica ed esposizione ad arsenico e l'esistenza di una relazione dose-risposta permette di escludere che fattori di confondimento abbiano determinato i risultati.

Per quello che riguarda le informazioni sulle abitudini al fumo, uno dei principali fattori di rischio per il tumore della vescica, è da notare che alcuni studi presentano stime di rischio corrette per questo fattore [31,33,34], mentre altre indagini non lo consentono [15,27-29]. In questi ultimi studi, comunque, la prevalenza dei fumatori tra i soggetti in studio non è elevata rispetto alle popolazioni di riferimento, e le dimensioni delle stime del rischio sono tali da escludere che esse siano dovute interamente al fumo di sigaretta.

Per quanto concerne la plausibilità biologica dell'associazione tra tumore della vescica ed esposizione ad arsenico attraverso l'acqua potabile, gli studi esaminati forniscono diverse indicazioni probanti:

1) Gli aumenti di rischio in relazione all'ingestione di arsenico sono stati sempre osservati sia per il tumore della vescica che per i tumori del polmone [15,27-31,34], del fegato [15,27-31], del rene [27-30] e della pelle [27-30], indicando che l'attività tumorigenica dell'arsenico si attua in particolari organi bersaglio che sono proprio quelli in cui si realizza l'accumulo e l'escrezione di questo elemento. D'altra parte negli studi di epidemiologia occupazionale relativi ai fonditori di rame, in cui l'esposizione ad arsenico avviene principalmente per inalazione, è stato ampiamente evidenziato un aumento significativo di rischio per il tumore del polmone, ma non per quello della vescica [49-51]. Il valore di esposizione cumulativa ad arsenico calcolato da Smith et al. [8] sulla base dei livelli di esposizione medi in uno studio di grandi dimensioni su questo gruppo occupazionale [52] risulta essere inferiore alla metà del valore calcolato a partire dal più

basso livello di esposizione (170 µg/l) presente a Taiwan [27]. L'incapacità ad evidenziare eccessi di rischio per il tumore della vescica in questa categoria lavorativa sembrerebbe dovuto quindi a più bassi livelli di esposizione [8,10].

2) L'associazione tra la frequenza di micronuclei nelle cellule esfoliative della vescica e la quantità di arsenico ingerito con l'acqua potabile [46] acquisisce un significato rilevante se si tiene conto del fatto che questo risultato si osserva anche in relazione all'esposizione ad altri fattori di rischio per il tumore della vescica, quali il fumo di sigaretta [53,54], la schistosomiasi [55,56] e le radiazioni alla zona pelvica [57].

3) Un'altra conferma nel considerare la vescica come uno degli organi bersaglio per l'attività cancerogena dell'arsenico proviene dallo studio statunitense [33], nel quale è stata evidenziata una relazione dose-risposta solo con l'indice di esposizione ad arsenico che stimava la concentrazione di questo elemento nelle urine, e quindi presumibilmente l'entità del contatto con l'epitelio vescicale.

4) Lo studio di cui sopra [33] ha inoltre evidenziato una relazione dose-risposta solo tra i fumatori, mentre tra i non fumatori, anche con i più alti livelli di esposizione ad arsenico, non si osservava un aumento di rischio significativo per tumore della vescica. Un incremento di rischio più elevato per tutti i tumori [34], per il tumore del polmone [31,34] e del fegato [31] è stato inoltre osservato tra i soggetti fumatori, rispetto ai non fumatori, in relazione ad ingestione di arsenico, anche negli altri due studi che presentano stime corrette per fumo di sigaretta.

L'interpretazione di questi risultati suggerirebbe che il fumo di sigaretta potenzi l'effetto dell'esposizione ad arsenico. Tale meccanismo potrebbe essere analogo al sinergismo tra fumo di sigaretta ed inalazione di arsenico nell'induzione del tumore del polmone [58-60], e potrebbe anche fornire una spiegazione del fatto che negli animali non è stata ancora adeguatamente dimostrata la cancerogenicità dei composti dell'arsenico. In effetti l'aggiunta di arsenico inorganico durante somministrazioni di dietilnitrosamina (un noto cancerogeno) causa un aumento dei tumori del rene nel ratto [61]. Queste ultime considerazioni sembrano evidenziare il fatto che l'arsenico necessita di un forte agente comutageno affinché possa manifestare la sua azione cancerogena, che non è mai diretta, avvalorando dunque l'ipotesi che il fumo di sigaretta possa essere almeno un iniziatore nella tumorigenesi indotta dall'arsenico [34].

Considerazioni conclusive

I criteri, generalmente condivisi, che definiscono il carattere causale di un'associazione epidemiologica [62] includono la riproducibilità dei risultati in studi indipendenti, condotti da diversi autori, e caratterizzati da popolazioni, ambienti di studio, circostanze e periodi di tempo differenti. L'evidenza prodotta dagli studi epidemiologici analizzati in questa rassegna, pur differenti per tipologia di indagine e per

periodi di realizzazione, deriva per lo più da uno stesso gruppo di ricerca e fondamentalmente da popolazioni di una stessa area (Taiwan); la mancanza di un adeguato numero di studi condotti in differenti zone geografiche che possano ulteriormente confermare l'associazione tra tumore della vescica ed arsenico nelle acque potabili, consiglia dunque un atteggiamento di cautela nell'esprimere conclusioni attraverso un processo di inferenza causale [10].

A questa considerazione va aggiunto che l'inadeguatezza delle conoscenze relative al meccanismo della cancerogenesi dell'arsenico rende estremamente difficile sviluppare modelli di valutazione quantitativa del rischio e, conseguentemente, la definizione di una appropriata normativa internazionale sul controllo dei livelli di arsenico nelle acque potabili.

La recente indicazione che l'arsenico induce in modo indiretto diversi tipi di danno genetico secondo relazioni dose-risposta di tipo sublineare [42], è un'importante elemento di plausibilità biologica per le analisi dei dati epidemiologici che suggeriscono la presenza di una relazione non lineare tra ingestione di arsenico e rischio dei tumori urinari e della pelle [42,63-66]. I modelli tradizionali che utilizzano relazioni dose-risposta di tipo lineare per la caratterizzazione del rischio associato a cancerogeni di tipo genotossico (assenza di soglia) potrebbero dunque non essere adatti allo studio della associazione tra tumore della vescica ed ingestione di arsenico con l'acqua potabile: la loro applicazione negli studi eseguiti su popolazioni esposte ad alti livelli di arsenico nell'acqua potabile rischierebbe di sovrastimare il rischio associato a basse dosi [42]. Se inoltre l'attività cancerogena dell'arsenico, come indicato da più fonti, si realizza solo in presenza di un cancerogeno diretto, è essenziale identificare lo stadio nel processo di tumorigenesi in cui l'esposizione a questo elemento diventa determinante. Allo stesso tempo è necessario individuare i meccanismi attraverso i quali l'arsenico interagisce con altri agenti mutageni. Questi problemi sono direttamente collegati con quello relativo all'identificazione di eventuali livelli critici (soglia) di esposizione.

Non è stato ancora chiarito se l'arsenico espliciti la sua azione nella fase di promozione o in quella di progressione del processo di tumorigenesi. Basarsi sull'una o l'altra ipotesi potrebbe modificare sensibilmente la correttezza nella stima della dose critica in quanto sposterebbe il rapporto temporale dell'interazione tra esposizione ad arsenico e quella ad altri fattori di rischio. Il potenziamento degli effetti dovuti ad altri agenti genotossici è stato ad esempio osservato quando l'esposizione ad arsenico segue quella ad alcuni comutageni, mentre nel caso in cui la preceda il risultato è una sostanziale protezione.

In conclusione, l'utilizzo di modelli basati su una relazione dose-risposta di tipo sublineare sembrerebbe un passo necessario ma non sufficiente per la corretta caratterizzazione del rischio di tumore della vescica associato all'esposizione ad arsenico; la precisione delle stime di rischio dipende infatti anche dalla comprensione del sinergismo tra esposizione ad arsenico e quella simultanea e/o pregressa ad altri agenti che concorrono alla cancerogenesi di questo tumore.

Pur non essendo dunque possibile definire un valore di soglia per l'esposizione ad arsenico che corrisponda ad un rischio trascurabile per il tumore della vescica, rimane la

necessità di definire adeguati valori limite per il contenuto di arsenico nelle acque potabili che non siano basati sulle sole stime di rischio per il tumore della pelle [8]. Sulla base dei risultati degli studi epidemiologici condotti in Taiwan l'United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) ha fissato un livello massimo (*maximum contaminant level*, MCL) per l'arsenico nell'acqua potabile pari a 50 µg/l [67]; tale valore è stato riconfermato nel 1994 [68]. In Italia il DPR 236 del 1988, che recepisce la Direttiva Comunitaria 778/80, stabilisce una concentrazione massima per l'arsenico nell'acqua potabile di 50 µg/l; il decreto sancisce inoltre che il controllo sul territorio deve essere effettuato con una frequenza di analisi che è a discrezione delle autorità sanitarie competenti [69]. La linea guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) è invece più restrittiva, indicando un valore guida provvisorio di 10 µg/l di arsenico nelle acque potabili, a cui corrisponde un aumento di rischio *lifetime* di tumore della pelle di 6×10^{-4} [70].

Sempre sulla base dei risultati degli studi condotti in Taiwan, Smith et al. [8] hanno valutato che bere 1 litro di acqua al giorno contenente 50 µg di arsenico è associato ad un aumento di rischio di morte per tumori del fegato, polmone, pelle o vescica di 13×10^{-3} . Negli Stati Uniti è stato stimato che, sebbene la maggior parte delle acque ad uso potabile contenga meno di 5 µg/l di arsenico, circa 350.000 persone bevono acqua contenente più di 50 µg/l di questo elemento e che circa 2.500.000 persone possono bere acqua con concentrazioni superiori a 25 µg/l [71]. Nel definire adeguati valori limite per l'ingestione di arsenico dovrebbe essere considerato che l'esposizione ad arsenico attraverso le acque potabili è un problema concernente la popolazione generale.

La necessità di proteggere la salute pubblica può richiedere talvolta di commettere un errore nel nome della cautela quando, come in questo caso, un crescente corpo di evidenze supporta la possibilità che l'arsenico nell'acqua potabile possa essere responsabile di un inaccettabile rischio di cancro [72].

Il valore di 10 µg/l proposto dall'OMS sembrerebbe dunque più cautelativo in termini di salvaguardia della salute pubblica in quanto tiene conto anche del possibile contributo dell'ingestione di arsenico attraverso altre fonti quali il cibo. La concentrazione di 10 µg/l è infatti in accordo con il valore guida provvisorio di 2 µg per kg di peso corporeo definito dal Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA) per l'ingestione giornaliera massima tollerabile (PMTDI) di arsenico inorganico e con livello provvisorio di 15 µg per kg di peso corporeo successivamente proposto per l'ingestione settimanale tollerabile (PTWI) di arsenico [73].

Tabella 1. - Arsenico nelle acque potabili: evidenze epidemiologiche

Nazione Periodo Riferimento	Disegno dello studio N° soggetti	Fonte dell'informazione sull'esposizione ad As	Indici e livelli di esposizione	Stime di rischio e significatività statistica	Note
Taiwan 1980-82 [31]	Caso- controllo 204 casi 368 controlli	Intervista con questionario	4 categorie di esposizione: anni di uso d'acqua contaminata	Tumore della vescica (69 casi) 0 anni OR= 1.0 1-20 anni OR= 1.3 21-40 anni OR= 1.7 > 40 anni OR= 4.0 $\chi^2 = 11.5$ ($p < 0.01$)	Studio condotto nell'area endemica per malattia vascolare periferica da ingestione cronica di As OR corretti per: età, sesso, fumo di sigaretta, dieta Relazione dose-risposta significativa anche per tumore del polmone e del fegato
Utah (USA) 1978 [33]	Caso- controllo 117 casi 266 controlli	Intervista con questionario Livello di As nell'acqua potabile, 1978-79	Indice 1: esposizione cumulativa totale (mg) Indice 2: esposizione cumulativa aggiustata per la quantità di liquidi ingeriti (mg/l/anni di esposizione)	Solo fumatori: 59 casi (10-19 anni di esposizione), Indice 2: mg/l/anno As (mg/l) OR I.C. 95% < 8 1.0 8 a < 10 1.4 (0.5-3.9) 10 a < 13 1.6 (0.5-4.5) ≥ 13 2.9 (1.1-8.0)	OR corretti per: età, sesso, anni di esposizione ad acqua superficiale clorata, storia di infezioni vescicali, livello di istruzione, urbanizzazione, storia lavorativa
Taiwan 1986-93 [34]	Coorte 2456 soggetti follow-up: 7 anni	Intervista con questionario Misure del livello di As nell'acqua potabile condotte in precedenti studi [74]	Esposizione cumulativa totale (mg/l/anni di esposizione), 4 categorie di esposizione	Tumore della vescica (29 casi): As (mg/l/anni) RR I.C. 95% 0 1.0 0.1-19.9 1.6 (0.4-5.6) > 20 3.6 (1.1-12.2) ignota 1.3 (0.4-4.1)	Studio condotto nell'area endemica per una malattia vascolare periferica dovuta ad ingestione cronica di As Le stime di esposizione cumulativa non tengono conto della quantità di acqua o liquidi ingeriti quotidianamente Le stime di rischio corrette per età, sesso, fumo di sigaretta e presenza di malattia vascolare
Giappone 1959-92 [15]	Coorte 454 soggetti follow-up: 33 anni	Livello di As nell'acqua potabile	3 categorie di esposizione ad As (ppm)	Nella categoria di esposizione più alta ≥ 1 mg/l: 3 tumori tratto urinario (2 tumori della vescica) SMR= 311.8 (I.C.95%= 86.2- 917.5)	Studio condotto in un'area in cui era presente un industria per la produzione di trisolfuro di As Proporzione di fumatori simile nelle tre categorie di esposizione

Legenda: U = uomini; D = donne; RR = Rischio Relativo; OR = Odds Ratio; IC = Intervallo di confidenza; As = arsenico.

Tabella 1 (continua). - Arsenico nelle acque potabili: evidenze epidemiologiche

Nazione Periodo Riferimento	Disegno dello studio N° soggetti	Fonte dell'informazione sull'esposizione ad As	Indici e livelli di esposizione	Stime di rischio e significatività statistica	Note
Taiwan 1973-86 [27-29]	Studio geografico 188 decessi per tumore della vescica	Misure del livello di As nell'acqua potabile eseguite nei periodi: 1962- 64 e 1974-75 nei diversi villaggi dell'area in studio	3 categorie di esposizione ad As	Tassi di mortalità per tumore della vescica corretti per età As (mg/l) Tassi ($\times 10^{-5}$) <0.30 15.7 (U), 16.7 (D) 0.30 - 0.59 37.8 (U), 35.1 (D) ≥ 0.60 89.1 (U), 91.5 (D) $p < 0.001$ Aumento di rischio di $1,2 \times 10^{-2}$ (U) e di $1,7 \times 10^{-2}$ (D) dovuto ad una ingestione <i>lifetime</i> di 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{giorno}$ di As [29]	Studio condotto in un'area endemica per una malattia vascolare periferica dovuta ad ingestione cronica di As I tassi di mortalità per tumore della vescica, nella popolazione generale di Taiwan, erano, nello stesso periodo, di $3,1 \times 10^{-5}$ (U) e di $1,4 \times 10^{-5}$ (D) La stima di incremento di rischio per tumore della vescica è comparabile a quelle relative ai tumori del polmone, del fegato e del rene
Taiwan 1972-83 [30]	Studio geografico 314 distretti	Misure del livello di As nell'acqua potabile nei diversi distretti dell'area in studio (83,656 pozzi) condotte nel periodo 1974- 76	Esposizione ad As: variabile continua 15.649 (18,7%) pozzi fornivano acqua con un livello di As $\geq 0,05$ mg/l	Analisi di regressione multipla: aumento del tasso di mortalità di $3,9 \times 10^{-5}$ (U) e di $4,2 \times 10^{-5}$ (D) per ogni incremento di 0,1 mg/l nel livello di As nell'acqua potabile	Studio condotto nello stato di Taiwan, inclusa l'area di endemismo per la malattia cronica da arsenico. I coefficienti di regressione sono corretti per indici di industrializzazione ed urbanizzazione I risultati sono comparabili a quelli relativi ai tumori di altri organi interni (fegato, rene e prostata), del polmone, della cavità nasale e della pelle
Argentina, Cile [16]	Studi geografici	Misure di As nell'acqua potabile		Argentina: SMR = 2.1 (I.C.95% = 1.8-2.5) (U) e 1.8 (I.C.95% = 1.2-2.6) (D) Cile: SMR = 6.1 (I.C.95% = 5.0-7.5) (U) e 8.3 (I.C.95% = 6.4-10.6) (D)	Non si hanno informazioni sulla presenza di eventuali fattori di confondimento

Legenda: U = uomini; D = donne; RR = Rischio Relativo; OR = Odds Ratio; IC = Intervallo di confidenza; As = arsenico.

BIBLIOGRAFIA

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1981. Environmental Health Criteria 18: Arsenic. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
2. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. 1980. IARC Monographs on the evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Some Metals and Metallic Compounds, Vol 23. IARC, Lyon.
3. TAMAKI, S. & FRANKENBERGER Jr W.T.. Environmental biochemistry of arsenic. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1992, 124: 79-110.
4. CHILVERS, D.C. & PETERSON P.J. 1987. Global cycling of arsenic. In: Lead, Mercury, Cadmium, and arsenic in the environment. T.C. Hutchinson & K.M. Meema (Eds). John Wiley & Sons Ltd, New York. p. 279-301.
5. SCHRAUFNAGEL, R.A. 1983. Arsenic in energy sources: a future supply or an environmental problem? In: Arsenic: industrial, biochemical environmental perspectives. W.H. Lederer & R.J. Fensterheim (Eds). Van Nostrand Reinhold, New York. p. 17-41.
6. ENTERLINE, P.E., HENDERSON V.L., MARSH G.M. Exposure to arsenic and respiratory cancer: a reanalysis. *Am.J.Epidemiol.* 1987, 125: 929-938.
7. USPHS. 1989. Toxicological profile for arsenic. Washington, DC.
8. SMITH, A.H., HOPENHAYN-RICH, C., BATES, M.N. NGOEDEN, H.M., HERTZ-PICCIOTTO, I., DUGGAN, H.M., WOOD, R., KOSNETT, M.J., SMITH, M.T. Cancer risks from arsenic in drinking water. *Environ. Health Perspect.* 1992, 97:259-267.
9. SQUIBB, K.S. & FOWLER, B.A. 1983. The toxicity of arsenic and its compounds. In: Biological and environmental effects of arsenic. B.A. Fowler (Eds). Elsevier, Amsterdam. p. 233-269.
10. BATES, M.N., SMITH, A.H., HOPENHAYN-RICH, C. Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *Am.J.Epidemiol.* 1992, 135: 462-476.
11. CUZICK, J., SASIENI, P., & EVANS, S. 1992. Ingested arsenic, keratoses, and bladder cancer. *Am.J.Epidemiol.* 136(4):417-421.
12. TSENG, W.P.. Blackfoot disease in Taiwan: a 30 year follow-up. *Angiology.* 1989, 45: 547-558.
13. KURTTIO, P., HAKALA, E., SANDSTRÖM, H., PEKKANEN, J. Exposure to arsenic from drinking water. *Epidemiology.* 1995, 6(4):S24.
14. HARRINGTON, J.M., MIDDAGH, J.P., MORSE, D.L. & HOUSWORTH, J. A survey of a population exposed to high concentrations of arsenic in well water in Fairbanks, Alaska. *Am.J.Epidemiol.* 1978, 108: 377-385.
15. TSUDA, T., BABAZONO, A., YAMAMOTO, E., KURUMATAMI, N., MINO, Y., OGAWA, T., KISHI, Y. & AOYAMA, H. Ingested arsenic and internal cancer: a historical cohort study followed for 33 years. *Am. J. Epidemiol.* 1995, 141:198-209.
16. SMITH, A.H., HOPENHAYN-RICH, C., MOORE, L.E., SMITH, M.T., WALDMAN, F. New epidemiological findings concerning arsenic and bladder cancer and proposed tumor biomarker studies. *Epidemiology.* 1995, 6(4):S29.
17. BALDANTONI, E. & FERRONATO, A. L'arsenico nelle acque sotterranee del Mediobrenta (Veneto). *Acqua Aria.* 1996, 5: 505-510.
18. SOLEO, L., ASSENNATO, G., MISCIAGNA, G., COLELLA, A., BASSO, A., METERA, L., SCRUTINIO, D., SOLMINI, R., GAGLIARDI, T. Deferred health survey. *Med Lav.* 1973, 3(suppl): 262-264
19. VAHTER, M. & MARAFANTE, E. Intracellular interaction and metabolic fate of arsenite and arsenate in mice and rabbits. *Chem-Biol. Interact.* 1983, 47: 29-44.
20. PERSHAGEN, T. & VAHTER, M. 1979. "Arsenic." National Swedish Environmental Protection Board (SNV PM 1128), Stockholm.
21. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 1988. "Special report on ingested inorganic arsenic: skin cancer; nutritional essentiality". (EPA/625/3-87/013). Risk Assessment forum, U.S Environmental Protection Agency, Washington, DC.

22. DANG, H.S., JAISWAL, D.D. & SOMASUNDARAM, S. Distribution of arsenic in human tissues and milk. *Sci.Total Environ.* 1983, 29: 171-175.
23. YAMAUCHI, H. & YAMAMURA, Y. Concentration and chemical species of arsenic in human tissue. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* 1983, 31: 267-277.
24. Life Systems, Inc. Toxicological profile for arsenic. Report No. ATSDR/TP-88/02 prepared for Agency for Toxic substances and Disease Registry, Atlanta, GA.
25. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. 1987. IARC Monographs on the evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Supplement 7. IARC, Lyon.
26. TOMATIS, L. AITIO, A., WILBOURN, J. & SHUKER, L. Human carcinogens so far identified. *Jpn.J.Cancer Res.* 1989, 80:795-807.
27. CHEN, C.J., KUO, T.L. & WU, M.M. Arsenic and cancers. *Lancet.* 1988, I: 414-415.
28. CHEN, C.J., KUO, T.L. & WU, M.M. Dose-response relation between arsenic concentration in well water and mortality from cancers and vascular diseases. *Am.J.Epidemiol.* 1989, 130(6): 1123-1132.
29. CHEN, C.J., CHEN, C.W., WU, M.M. & KUO, T.L. Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *Br.J.Cancer* 1992, 66(5): 889-892.
30. CHEN, C.J. & WANG, C.J. Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms. *Cancer Res.* 1990, 50: 5470-5474.
31. CHEN, C.J., CHUANG, Y.C., YOU, S.L., LIN, T.M. & WU, H.Y. A retrospective study on malignant neoplasms of bladder, lung and liver in blackfoot disease endemic area in Taiwan. *Br.J.Cancer* 1986, 53: 399-405.
32. HARTGE, P., CAHILL, J.I., WEST, D., HAUCK, M., AUSTIN, D., SILVERMAN, D., HOOVER, R. Design and methods in a multi-center case-control interview study. *Am.J.Public Health.* 1984, 74: 52-56.
33. BATES, M.N., SMITH A.H. & CANTOR, P. Case-control study of bladder cancer in drinking water. *Am.J.Epidemiol.* 1995, 141:523-530.
34. CHIOU, H.Y., HSUEH, Y.M., LIAW, K.F., HORNG, S.F., CHIANG, M.H., PU, Y.S., LIN, J.S-N., HUANG, C.H. & CHEN, C.J. Incidence of internal cancers and ingested inorganic arsenic: a seven-year follow-up study in Taiwan. *Cancer Res.* 1995, 55: 1296-1300.
35. LEE, T.C., OSHIMURA, M. & BARRET, J.C. Comparison of arsenic-induced cell transformation, cytotoxicity, mutation and cytogenetic effects in Syrian hamster embryo cells in culture. *Carcinogenesis.* 1985, 6(10): 1421-1426.
36. LI J.H. & ROSSMAN T.G.. Comutagenesis of sodium arsenite with ultraviolet radiation in Chinese hamster V79 cells. *Biol. Metals.* 1991, 4: 197-200.
37. MOORE, M.M., HARRINGTON-BROCK, K. & DOERR, C.L. 1993. Genotoxicity of arsenic and its methylated metabolites. In: Arsenic: exposure and health. W.R. Chappell, C.O. Abernathy & C.R. Cothorn (Eds). Science and technology letters, Norwood, England.
38. BECKMAN, G., BECKMAN L., NORDENSON, I. Chromosome aberrations in workers exposed to arsenic. *Environ.Health.Perspect.* 1977, 19: 145-146.
39. LEE, T.C., TANAKA, N., LAMB, P.W., GILMER, T. & BARRET, J.C. Induction of gene amplification by arsenic. *Science.* 1988, 241: 79-81.
40. LEE, T.C., WANG-WUU, S., HUANG, R.Y., LEE, K.C.C. & JAN, K.Y. Differential effects of pre- and post-treatment of sodium arsenite on the genotoxicity of methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 1986, 46: 1854-1857.
41. STÖHRER, G.. Arsenic: an opportunity for risk assessment. *Arch Toxicol.* 1991, 65:525-531.
42. RUDEL, R., SLAYTON, T.M. & BECK, B.D. Implications of arsenic genotoxicity for dose-response of carcinogenic effects. *Regulat.Toxicol.Farmacol.* 1996, 23: 87-105.
43. BROWN, C.C. & CHU, K.C. A new method for the analysis of cohort studies: implication of the multistage theory of carcinogenesis applied to occupational arsenic exposure. *Environ.Health Perspect.* 1983, 50:293-308.
44. BARRETT, J.C. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ.Health Perspect.* 1993, 100: 9-20.

45. MASS, M.J. Human carcinogenesis by arsenic. *Environ.Geochem. Health.* 1992, 14: 49-54.
46. WARNER, M.L., MOORE, L.E., SMITH, M.T., KALMAN, D.A., FANNING, E. & SMITH, A.H. Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest arsenic-contaminated water in Nevada. *Cancer.Epidemiol.Biomarkers.Prev.* 1994, 3: 583-590.
47. MARCUS, W.L. & RISPIN, A.S. 1988. Threshold carcinogenicity using arsenic as an example. In: *Advances in modern environmental toxicology: risk assessment and risk management of industrial and environmental chemicals*. C.R. Cothorn & M.A. Mehlman (Eds). Princeton publishing, Princeton, NJ, p. 133-158.
48. HOPENHAYN-RICH, C., SMITH, A.H. & GOEDEN, H.M. Human studies do not support the methylation threshold hypothesis for the toxicity of inorganic arsenic. *Environ.Res.* 1993, 60: 161-177.
49. OTT, M.G. HOLDER, B., GORDON, H. Respiratory cancer and occupational exposure to arsenicals. *Arch.Environ.Health* 1974, 29: 250-255.
50. LUBIN, J.H., POTTERN, L.M., BLOT, W.J.TOKUDOME, S., STONE, B.J. & FRAUMENI F. Respiratory cancer among copper smelter workers: recent mortality statistics. *J.Occup.Med.* 23: 779-784.
51. ENTERLINE, P.E., DAY, R., MARSH, G.M. Cancers related to exposure to arsenic at a copper smelter. *Occup.Environ.Med.* 1995, 52: 28-32.
52. ENTERLINE, P.E. & MARSH, G.M. Cancers among workers exposed to arsenic and other substances in a copper smelter. *Am.J.Epidemiol.* 1982, 116: 895-911.
53. REALI, D., MARINO, F., BAHRAMANDPOUR, S., CARDUCCI, A., BARALE, R. & LOPRIENO, R. 1987. Micronuclei in exfoliated urothelial cells and urine mutagenicity in smokers. *Mutat.Res.* 1982, 192: 145-149.
54. FONTHAM, E., CORREA, P., RODRIGUES, E. & LIN, Y. 1986. Validation of smoking history with the micronuclei test. In: *Mechanisms in tobacco carcinogenesis, banbury report No 23*. D. Hoffman & C. Harris (Eds). Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 113-119.
55. RAAFAT, M., EL-GERZAWI, S. & STICH, H.F. Detection of mutagenicity in urothelial cells of bilharzial patients by: "the micronucleus test". *J.Egypt.Natl.Cancer Inst.* 1984, 1(3): 63-73.
56. ROSIN, M. & ANWAR, W. Chromosomal damage in urothelial cells from Egyptians with chronic *Schistosoma haematobium* infections. *Int.J.Cancer.* 1992, 50(4): 539-543.
57. STICH, H.F., SAN, R.H.C. & ROSIN, M.P. Adaption of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1983, 407: 93-105.
58. RENCHER, A.C., CARTER, M.W., MCKEE, D.V. A retrospective epidemiological study of mortality at a large western copper smelter. *J.Occup.Med.* 1977, 19: 754-758.
59. PERSHAGEN, G. Lung cancer mortality among men living near an arsenic-emitting smelter. *Am.J.Epidemiol.* 1985, 122: 684-694.
60. HERTZ-PICCIOTTO, I., SMITH, A.H., HOLTZMAN, D., LIPSETT, M. & ALEXEEFF, G. Synergism between occupational arsenic exposure and smoking in the induction of lung cancer. *Epidemiology* 1992, 3: 23-31.
61. SHIRACHI, D.Y., JOHANSEN, M.G., MCGOWAN, J.P. Tumorigenic effect of sodium arsenite in rat kidney. *Proc West Pharmacol Soc* 1983, 26:413-415.
62. HILL, D.Y. The environment and disease: association or causation? *Proc.R.Soc.Med.* 1965, 58: 295-300.
63. BROWN, K.G. & CHEN, C.J. 1994. Observed dose-response for internal cancers and arsenic in drinking water in the blackfoot disease endemic region of Taiwan. In: *Arsenic: exposure and health*. W.R. Chappell, C.O. Abernathy & C.R. Cothorn (Eds). Science and technology letters, Norwood, England. p. 153-170.
64. BROWN, K.G. & CHEN, C.J. Significance of exposure assessment to analysis of cancer risk from inorganic arsenic in drinking water in Taiwan. *Risk Anal.* 1995, 15(4): 475-484.

65. GUO, H.R., LIPSITZ S.R., HU, H. & MONSON, R.R. 1994. Dose-response relationship between arsenic in drinking water and skin cancer. Presentation at the Society for Environmental Geochemistry and Health. Salt Lake City, UT. July 18-19.
66. GUO, H.R., CHANG, H.S., HU, H., LIPSITZ, S.R., & MONSON, R.R. 1994. Arsenic in drinking water and urinary cancers: a preliminary report. In: Arsenic: exposure and health. W.R. Chappell, C.O. Abernathy & C.R. Cothorn (Eds). Science and technology letters, Norwood, England. pp 119-128.
67. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 1992. Drinking water regulations and health advisories. Office of Water. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
68. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 1994. Drinking water regulations and health advisories. Office of Water. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
69. DPR 24 maggio 1988, n. 236 Drinking water regulations and health advisories. Office of Water. Environmental Protection Agency, Washington, DC.. Attuazione della direttiva CEE n. 80/778. concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, ai sensi dell'art. 15 L. 16 aprile 1987, n. 183. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, Suppl. Ord. n. 152 del 30 giugno 1988.
70. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1993. guidelines for drinking water quality , second edition, Vol. 1, Recommendations. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
71. SCIENCE APPLICATIONS INTERNATIONAL CORPORATION. Estimated national occurrence and exposure to arsenic in public drinking water supplies. 1987. Revised draft, prepared for U.S. Environmental Protection Agency under contract no. 68-01-766. EPA, Washington, DC.
72. MORRIS, R.D. Drinking water and cancer. *Environ.Health Perspect.* 1995, 103(suppl 8):225-232.
73. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1988. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Prepared by the 33rd meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee in Food Additives. WHO Food Additives Series no. 24, WHO, Geneva, Switzerland.
74. LAI, M.S., HSUEH, Y.M., CHEN, C.J., SHYU, M.P., CHEN, S.Y., KUO, T.L., WU, M.M. Ingested inorganic arsenic and prevalence of diabetes mellitus. *Am.J.Epidemiol.* 1994, 139: 1-9.

BATTERI AMBIENTALI PATOGENI OPPORTUNISTI IN ACQUE POTABILI

Lucia Bonadonna

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Rilevanza igienico-sanitaria della problematica

La necessità di disporre di acque di sicura affidabilità per il consumo umano impone che vengano svolti accurati controlli nell'ambito di una efficace azione preventiva per la salute dei consumatori. Tuttavia anche se il mezzo idrico può costituire un veicolo di trasmissione di patogeni, il controllo batteriologico delle acque destinate al consumo umano non si basa sulla ricerca diretta dei patogeni. Infatti, le analisi routinarie fanno riferimento a gruppi microbici di per sé non patogeni, ma in grado di esprimere l'esistenza o meno di una contaminazione microbica, in tempi rapidi e con metodi facilmente applicabili. L'uso degli indicatori fornisce tuttavia una probabilità, non la certezza della presenza di patogeni. Infatti il rilevamento dei microrganismi indicatori di contaminazione fecale costituisce solo il sospetto di un rischio: la presenza di microrganismi patogeni può essere verificata solo con analisi mirate ovvero valutando dati epidemiologici.

Grazie all'evoluzione degli studi e delle ricerche in materia ambientale e all'utilizzazione di metodi analitici più sensibili, si è potuto verificare che non sempre le patologie di origine idrica sono associate a microrganismi di origine enterica. Infatti, se da una parte nei Paesi ad alto standard igienico è accertato che sono diminuite le patologie di origine idrica legate alla presenza dei tradizionali patogeni primari, quali *Salmonella*, *Shigella* e *Vibrio*, dall'altra si ammette che di una cospicua parte delle patologie riscontrate nell'ultimo decennio non se ne riconosce la causa [1]. Sembra infatti che a un declino delle infezioni tradizionali si accompagni un aumento delle patologie da parte di patogeni diversi [2]. Spesso si tratta di patogeni endemici, cioè microrganismi che fanno parte della normale flora endogena che, anche per la rottura di un equilibrio biologico, possono prendere il sopravvento. In più, mentre le tecnologie di trattamento e di sanitizzazione delle acque, di quelle potabili, come di quelle reflue, comportano una riduzione dei microrganismi di origine enterica, tra cui gli stessi indicatori di contaminazione fecale (coliformi e streptococchi), contestualmente incrementano e stimolano lo sviluppo di flora batterica più generalmente ambientale, composta da potenziali patogeni occasionali [3].

Negli ultimi anni, nelle reti di distribuzione sono state evidenziate contaminazioni batteriche, non determinate dal contatto con materiale fecale, ma favorite, oltre che da meccanismi di adattamento e sopravvivenza da parte dei microrganismi stessi, anche da una serie di circostanze ambientali favorevoli. L'acqua trattata è infatti batteriologicamente diversa da quella grezza e un deterioramento della sua qualità può

verificarsi anche nella rete di distribuzione. Questo tipo di fenomeni può essere ricollegato a molteplici fattori tra cui il rilascio di microrganismi colonizzatori dei biofilm e la moltiplicazione e la ricrescita batterica sia di microrganismi stressati dai trattamenti di potabilizzazione, sia degli stessi autoctoni ambientali [4, 5]. Questi casi possono essere la manifestazione non solo di una insufficiente manutenzione delle reti di distribuzione e di una ridotta efficienza dei sistemi di disinfezione, ma anche della capacità dei microrganismi, una volta superate le barriere sanitarie, di persistere e moltiplicarsi anche in condizioni ambientali ostili. In acque oligotrofe, quali sono quelle potabili, i microrganismi, costretti ad adattarsi ad un basso tenore di nutrienti, sono in grado di sviluppare una capacità di adattamento che, tramite una serie di modificazioni genotipiche e fenotipiche, consente loro di sopravvivere e di moltiplicarsi [6]. Inoltre, modificando la permeabilità della membrana cellulare, producendo capsule extracellulari, aderendo a superfici o associati a macroinvertebrati, essi possono aumentare la resistenza ai trattamenti di disinfezione.

Relativamente ai patogeni tradizionali è stato per esempio osservato che le forme rugose di *Vibrio cholerae* possono comportare una diversa resistenza alla clorazione: producono una matrice intercellulare che favorisce l'aggregazione cellulare che fornisce protezione al microrganismo nei confronti di avverse condizioni ambientali [7]. Diverso comportamento è stato messo in evidenza per alcuni biotipi, capsulati e non, di *Klebsiella pneumoniae* in cui la resistenza nei confronti della clorazione aumentava in funzione della diminuzione della concentrazione di nutrienti [8].

Esistono oggettive difficoltà legate all'individuazione dei microrganismi ambientali nelle acque. I metodi tradizionali utilizzati per il rilevamento di specifici microrganismi risultano spesso poco sensibili e tendono a sottostimare il reale carico microbico. Inoltre, i microrganismi sottoposti a condizioni di stress ambientale, pur continuando a rimanere metabolicamente attivi, possono perdere la capacità di moltiplicarsi in condizioni standard di laboratorio. Questo meccanismo è caratterizzato in generale da una bassa attività metabolica e da una lenta utilizzazione delle risorse energetiche. Pertanto, se si tenta di isolare questi microrganismi, molto spesso essi non vengono rilevati. Questa condizione di quiescenza, fenomeno molto diffuso nella microbiologia ambientale, rappresenta una nuova prospettiva e dà un significato dinamico al termine "sopravvivenza". La sua rilevanza è legata alla nozione che dei microrganismi presenti nell'ambiente acquatico se ne riesce spesso ad evidenziare una percentuale molto bassa: stress ambientale ed eccessiva selettività dei terreni colturali possono ridurre le conte di 100-1000 volte. Tuttavia, anche i metodi innovativi, come quelli che utilizzano la microscopia a fluorescenza o l'amplificazione del genoma, non risolvono sostanzialmente il problema: non danno indicazioni sulla vitalità o la virulenza dei microrganismi individuati che comunque, anche nella condizione di quiescenza, possono essere ancora in grado di produrre patologie.

I patogeni opportunisti possono dare luogo a forme morbose in favorevoli condizioni ambientali e di predisposizione da parte di soggetti debilitati, immunodepressi, sottoposti a particolari terapie, o anche in persone anziane e bambini. E' noto che la loro presenza nelle acque in distribuzione può costituire un serio rischio per la salute in ambito

ospedaliero [9]. Inoltre, la crescente attenzione rivolta alla categoria dei patogeni opportunisti è anche legata al ruolo che essi possono svolgere nell'evoluzione della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) [10].

Alcuni di questi microrganismi, oltre ad appartenere alla flora batterica endogena, possono essere largamente diffusi in natura e far parte della flora batterica ambientale, ritrovandosi così nelle acque, nel suolo e nell'aria.

Nell'ambiente, la coesistenza di specie microbiche diverse può creare le condizioni favorevoli alla formazione di specie microbiche resistenti agli antibiotici [11]. Inoltre, come evento naturale, possono verificarsi interazioni genetiche che, con meccanismi di trasferimento di genoma, favoriscono la creazione di nuovi genotipi.

Presenti nell'ambiente, i microrganismi che possono comportarsi come patogeni, possono ritrovarsi anche nelle acque potabili trattate e quindi giungere all'utente.

Importanza della problematica a livello nazionale

Sebbene non sia incluso tra i parametri da ricercare per la valutazione della qualità delle acque destinate ad uso potabile, *Aeromonas hydrophila* è isolato molto frequentemente in Italia nelle acque potabili in distribuzione. Infatti, è facile rilevarlo su uno dei terreni colturali utilizzati per l'enumerazione dei coliformi totali (m-Endo agar) dove produce la maggior parte delle colonie rosse atipiche [14]. La sua presenza è stata rilevata anche in assenza di *Escherichia coli* e difficile risulta stabilire un rapporto tra le sue densità e quelle degli indici di contaminazione, soprattutto in acque poco inquinate e in acque potabili trattate. Infatti, con i trattamenti di clorazione vengono eliminati i microrganismi indicatori, ma soltanto ridotti in numero i membri appartenenti al genere *Aeromonas*.

Il significato della presenza di *A. hydrophila* nelle acque destinate al consumo umano deve ancora essere definito e necessita di ulteriori ricerche, d'altronde tuttora in corso, soprattutto a livello internazionale. E' stato ipotizzato che diversi possono essere i fattori che intervengono al suo mantenimento in questo tipo di acque.

Un aumento delle sue densità in queste acque generalmente è stato messo in relazione ad una diminuzione della concentrazione di cloro libero in rete, sebbene più autori abbiano evidenziato che alte densità di *A. hydrophila* possono essere rilevate anche in acque clorate, soprattutto nel periodo estivo (100-150 UFC/100 mL). Infatti, il suo rilevamento sembra seguire un andamento stagionale con variazioni associate alla temperatura dell'acqua e alla concentrazione di cloro presente. Tuttavia, le densità del microrganismo possono aumentare nel corso della distribuzione dell'acqua in rete anche a basse temperature perché esso può anche moltiplicarsi intorno ai 5°C.

Diversi studi hanno anche indicato che, nonostante la clorazione, può essere assicurata la sopravvivenza di membri del genere *Pseudomonas*, *Moraxella* e *Acinetobacter*, tutti riconosciuti come patogeni occasionali [6]. Tra questi *Pseudomonas* è forse l'opportunisto patogeno più diffuso e conosciuto [12]. E' nota la sua versatilità nutrizionale e il suo adattamento alle più diverse condizioni ambientali che gli

permettono di sopravvivere in presenza di antibiotici ed erbicidi, in soluzioni disinfettanti e in condizioni estreme di temperatura, pH e contenuto salino. Sebbene la maggior parte delle specie di *Pseudomonas* siano considerate non patogene, alcune lo possono diventare in condizioni di predisposizione dell'ospite. *Pseudomonas aeruginosa* possiede una patogenesi multifattoriale, difficile da caratterizzare accuratamente, una dose infettante relativamente elevata (10^9 cellule) e mostra un'aumentata virulenza in pazienti malati di cancro e di fibrosi cistica. Essendo un microorganismo di origine ambientale, la presenza di *Pseudomonas* nelle acque potabili è molto frequente. Data la sua resistenza al cloro, maggiore rispetto a quella degli indicatori di contaminazione fecale, è possibile ritrovarlo anche in loro assenza. Una volta introdotto nel sistema di distribuzione dell'acqua può resistere per lunghi periodi ed essere rilasciato irregolarmente. E' un forte degradatore ed è in grado di utilizzare acidi decarbossilici presenti in acque condottate anche a basse concentrazioni. Si concentra e viene isolato in alte densità sulle resine e sui carboni attivi che fanno parte degli apparecchi domestici utilizzati come addolcitori o correttori di sapori di cloro nell'acqua. Inoltre, in rete, può, insieme ad altri microrganismi, contribuire alla formazione di biofilm e all'alterazione delle caratteristiche organolettiche delle acque.

Per seguire l'efficienza dei processi di trattamento delle acque viene utilizzato, quale parametro di legge, il Conteggio delle colonie su agar. Questo indice, negli ultimi anni, ha acquisito una certa valenza sanitaria in quanto, in condizioni analitiche idonee, può permettere di isolare alcuni dei microrganismi considerati patogeni occasionali. L'USEPA ha ipotizzato che una carica batterica di 10^6 UFC/mL, caratterizzata da un basso indice di diversità, potrebbe comportare un rischio reale per soggetti immunocompromessi.

Alcuni dei microrganismi che si rilevano con la Conta batterica, in condizioni idonee di temperatura e di tempi di incubazione, producono colonie pigmentate a lenta crescita. Sono batteri pigmentati che possono costituire la flora dominante in acque potabili clorate. L'aspetto più importante della loro presenza nelle acque in distribuzione è legato alla loro potenzialità di patogeni, nonostante sia comunque difficile stabilire correlazioni tra patologie e loro diffusione nelle acque clorate. La maggior parte di essi sono caratterizzati per essere strettamente aerobi e gram-negativi. In alcuni casi, è difficile identificarli in quanto non inseriti in alcuno schema tassonomico; ciò è attribuibile alla possibilità che si tratti di microrganismi di origine strettamente ambientale che i classici sistemi di identificazione biochimica non sono in grado di caratterizzare.

Flavobacterium è quello che tra i batteri pigmentati è isolato più di frequente, anche se spesso non evidenziato con le normali procedure di rilevamento. Esso viene considerato uno dei microrganismi che fanno parte della componente autoctona delle acque potabili. E' in grado di moltiplicarsi nelle acque di rubinetto anche in assenza di fonti di carbonio, ha una elevata versatilità nutrizionale e una elevata resistenza alla clorazione. Isolato in acque trattate, dopo esposizione ad una concentrazione di cloro libero di 0,75 mg/L per 60 min di contatto, le sue densità possono mantenersi ancora elevate (2900 UFC/mL). Il suo ruolo di patogeno occasionale è soprattutto legato alla sua capacità di colpire i neonati. In particolare, *Fl. meningosepticum* può causare meningiti epidemiche in neonati immaturi, batteriemie e polmoniti.

Dati epidemiologici storicamente documentati sono quelli relativi a microrganismi, appartenenti a diversi gruppi tassonomici, come *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Legionella* e i micobatteri indicati sotto il nome di "micobatteri ambientali potenzialmente patogeni" (PPEM, Potentially Pathogenic Environmental Mycobacteria) che sono considerati tra i più attuali agenti potenziali di malattia [13].

I micobatteri, come tutti i patogeni occasionali costituiscono un rischio per individui con difese immunitarie ridotte. Sono in grado di colonizzare le mucose nasofaringee ed intestinali di coloro che bevono acqua contaminata o sono esposti alla aerosolizzazione di acqua in cui sono presenti. E' stato comunque osservato che possiedono una scarsa invasività probabilmente dovuta alla loro incapacità di competere con i membri della normale flora presente sulla superficie delle mucose.

Proposte operative per il contenimento e il controllo degli inquinamenti

Micobatteri ambientali possono essere anche isolati da acqua di rete; essi infatti sono saprofiti delle acque e del suolo e la loro presenza è di norma correlata al contatto con acque superficiali contaminate da animali. La loro resistenza al cloro è elevata: per eliminarli occorrono 0,3-0,7 mg/L di cloro residuo totale a pH 7 con tempi di contatto superiori ai 30 min. Veicolati dalle acque sembra più probabile che essi colonizzino con più facilità il rompigitto del rubinetto da cui sono spesso rilevati in alte densità. Studi effettuati in Olanda hanno messo in evidenza che, mentre il 49% dei campioni prelevati da rubinetti risultavano contaminati da *My. kansasii*, solo l'1% di quelli raccolti nei sistemi di distribuzione dell'acqua davano la stessa positività. In Italia non si hanno dati ugualmente dettagliati.

Per quanto riguarda *A. hydrophila* non esistono valori limite relativi alla sua presenza nelle acque destinate al consumo umano. Le uniche indicazioni a riguardo sono quelle relative ad alcuni valori massimi "indicativi" stabiliti dalle autorità olandesi per la presenza di *Aeromonas* nelle acque potabili: 20 UFC/100 mL nelle acque all'impianto di produzione e 200 UFC/100 mL nelle acque durante la distribuzione. Valori superiori a questi richiedono accertamenti ulteriori per la verifica delle condizioni dell'impianto e del sistema di distribuzione che possono anche comprendere la determinazione del cloro libero e della temperatura dell'acqua.

Poiché il ruolo dell'acqua potabile quale vettore di *Aeromonas* potenzialmente patogeni non è ancora stato definito, scarsi e frammentari sono gli studi sulla eliminazione di *A. hydrophila* nelle acque.

Le ricerche effettuate sulla sua resistenza al cloro hanno dimostrato che c'è una ampia variabilità. Da studi svolti in Danimarca, *Aeromonas hydrophila* risulta meno suscettibile rispetto ad altre specie appartenenti allo stesso genere. Sembra, però meno resistente rispetto ad altri gram negativi a basse concentrazioni di NaOCl (*E. coli*, *Klebsiella*) nonostante il fatto che venga rilevato anche con basse densità di questi microrganismi, o addirittura in loro assenza.

Sebbene il ruolo di *Aeromonas* come patogeno gastrointestinale sia ancora dibattuto [15], gli studi effettuati sembrano confermare che almeno alcuni ceppi possono essere agenti di malattie a carattere diarroico [16]. Studi svolti negli Stati Uniti hanno evidenziato che il 70% dei ceppi di *Aeromonas hydrophila*, rilevati in acque clorate, erano enterotossigeni e pertanto potenziali patogeni enterici. Le gastroenteriti sono state indicate come le più comuni manifestazioni cliniche associate alla presenza di *Aeromonas*. Pur tuttavia, episodi diarroici sono stati riportati con densità di *Aeromonas* nelle acque altamente variabili: 1-50 UFC/100 mL, 50-150 UFC/100 mL e 100-64000 UFC/100 mL [15].

Allo stato attuale delle conoscenze sembra accertata l'esistenza, tra il gruppo degli *Aeromonas*, di specie enteropatogene [17]. Pertanto, in attesa di una definitiva valutazione sul significato sanitario delle specie di *Aeromonas*, si ritiene necessario, a scopo preventivo, limitarne la densità e le possibilità di replicazione e di insediamento negli impianti di distribuzione delle acque potabili.

Da quando nel 1976 a Philadelphia si verificò un'epidemia di polmonite il cui agente patogeno, fino ad allora sconosciuto, fu individuato come *Legionella pneumophila* sono stati effettuati numerosi studi epidemiologici. La dose infettante può variare, tra i singoli soggetti colpiti dall'infezione, tra 10^2 e 10^4 cellule.

La più importante epidemia di polmonite da legionella verificatasi in Italia venne riconosciuta all'Ospedale delle Molinette di Torino nel 1984 [18] e la sorgente di infezione venne identificata nell'acqua dell'impianto idrico.

Legionella è un microrganismo di origine ambientale [19], il suo habitat è quello naturale e, in particolare, la sua presenza è associata ad un elevato grado di umidità. E' stata frequentemente rilevata la sua presenza negli impianti idraulici dell'acqua potabile, sia calda che fredda, ed è stato ipotizzato che l'infezione avvenga per formazione di aerosol contaminati durante l'uso di docce, rubinetti, idromassaggi, fontane, oppure attraverso la sua nebulizzazione dai sistemi di condizionamento dell'aria. La sua concentrazione negli impianti di distribuzione dell'acqua è variabile e oscilla mediamente intorno a 10 UFC/L. Tuttavia *Legionella pneumophila* è stata isolata anche dall'apparato digerente per cui forse non si dovrebbe escludere la possibilità di una infezione per ingestione, anche se non ancora provata.

Diversi studi sono stati compiuti per determinare la capacità di sopravvivenza di *Legionella* nelle acque di rubinetto [20]. E' in grado di sopravvivere per 299 giorni in acqua potabile a 24 e 5°C, mentre a 35°C non viene più rilevata dopo 56 giorni. La temperatura ambiente e quella di frigorifero sono quindi favorevoli alla sua sopravvivenza. La sua resistenza al cloro è circa equivalente a quella di *Escherichia coli*. Una concentrazione di 0,2 mg/L di cloro residuo è in grado di eliminare in 2 ore il 90% di *Legionella pneumophila* presente nelle acque. Sopravvive sulla superficie delle tubature incrostate da depositi calcarei o corrose o dove si formino ristagni di acqua.

Per bonificare un impianto idraulico colonizzato da *Legionella* sembra più efficace l'abbinamento dell'azione del cloro con la temperatura elevata dell'acqua (1-2 mg/L di cloro residuo libero a 60°C); tuttavia questa pratica, mantenuta anche per lunghi periodi,

deve essere accompagnata dall'eliminazione delle incrostazioni nelle tubature e dei ristagni di acqua nell'impianto.

Quanto fin qui esposto, pur costituendo una panoramica oltremodo ridotta dell'argomento, invita comunque ad approfondire il ruolo che questi microrganismi possono svolgere, in considerazione delle metodologie per il loro rilevamento [21], della loro elevata resistenza nell'ambiente e della loro diffusione nelle acque superficiali sempre più spesso utilizzate per la produzione di acqua potabile.

BIBLIOGRAFIA

1. *Waterborne diseases in the United States*. CRC Press, G.F. Craun (Ed), Boca Raton, Fla, 1986.
2. Workshop on opportunistic pathogens: occurrence, detection and significance. In: *American Water Works Association Conference*. Norfolk, Virginia, December 6, 1983.
3. SOBSEY, M.D., DUFOUR, A.P., GERBA, C.P., LECHEVALLIER, M.W., AND PAYMENT, P. Using a conceptual framework for assessing risks to health from microbes in drinking water. *J. Am. Water Work Ass.* 1993, 85:44-48.
4. BONADONNA, L., VILLA, L. 1993. Patogeni opportunisti: un problema emergente. In: *Giornate di studio "Acqua per uso potabile"* A Frigerio (Ed), 93-100. Milano, febbraio, 1993.
5. CARRARO, E., FEA, E., SBARATO, L., SFERATI, S., AUDISIO, G., GILLI, G. Problemi igienico-sanitari correlati ai fenomeni di crescita e ricrescita batterica nella rete di distribuzione dell'acqua potabile. *Biologi Italiani* 1995, 4: 22-25.
6. BONADONNA, L. La Conta Batterica Totale. In: *Aspetti microbiologici e chimici delle acque destinate al consumo umano*. L. Volterra, M. Ottaviani (Ed). Rapporti ISTISAN 91/36, 260 pp.
7. RICE, E.W., JOHNSON, C.J., CLARK, R.M. *et al.* Chlorine and survival of "rugose" *Vibrio cholerae*. *The Lancet* 1992, 430: 740.
8. LECHEVALLIER, M.W., CAWTHON, C.D., AND LEE, R.G. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, 54:649-654.
9. FAVERO, M.S., CARSON, L.A., BOND, W.W., PETERSEN, N.J.. *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. *Science* 1971, 173:836-838.
10. CENTER FOR DISEASE CONTROL. The second 100,000 cases of AIDS-US, June 1981-December 1991. *Morbid. Mortal. Weekly Rept.* 1992, 41:28-33.
11. ARMSTRONG, J.L., CALOMIRIS, J.J., AND SEIDLER, R.J. Selection of antibiotic-resistant standard plate count bacteria during water treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, 44: 308-316.
12. VASIL, M.L. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J. Pediatr.* 1986, 108:800-804.
13. COLINS, C.H., GRANGE, J.M., YATES, M.D. A review: Mycobacteria in water. *J. Appl. Bacteriol.* 1984, 57: 93-102.
14. BONADONNA, L. Coliformi totali sul substrato mEndo: un parametro critico nella routine delle analisi microbiologiche. *Tecn. San.* 1994, 32: 151-159.
15. BONADONNA, L., DI GIROLAMO, I. *Aeromonas* in acque potabili: un rischio reale o potenziale? *Ig. San. Pubbl.* 1994, 50: 81-90.
16. BONADONNA, L. Dati non pubblicati.
17. ALTWEGG M., AND GEISS H.K. *Aeromonas* as a human pathogen. *Crit. Rev. Microbiol.* 1989, 16:253-286.
18. MOIRAGHI RUGGENINI, A., CASTELLANI PASTORIS, M., DENNIS, P.J., BARRAL, C., SCIACOVELLI, A., CARLE, F., BOLGIANI, M., PASSARINO, G., MINGRONE, M.G., PASSI, C., AND LOMBARDO, M. *Legionella pneumophila* in a hospital in Torino, Italy. A retrospective one year study. *Epidem. Inf.* 1989, 102:21-29.

I VIRUS NELL'ACQUA

Michele Muscillo, Giuseppina La Rosa

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

1. Introduzione

I virus enterici immessi nell'ambiente acquatico con le feci ed urine umane ed animali sono costantemente rilevati nei liquami [1, 2], nelle acque di superficie [3, 4], nelle acque trattate per la potabilizzazione [5], ed in quelle adibite ad attività ricreative [6, 7], nelle acque di mare e di estuario [8, 9, 10, 11, 12]. La capacità dei virus di sopravvivere a lungo nell'acqua [13] gioca un ruolo fondamentale nella trasmissione delle malattie infettive, in quanto l'esposizione a virus enterici può portare ad uno stato endemico della loro diffusione nella popolazione [14].

Il DPR 24 maggio 1988, n.236 riguarda l'attuazione della direttiva CEE n.80/778 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, ai sensi dell'art. 15 della legge 16 aprile 1987, n. 183 (pubblicato nel supplemento alla Gazzetta Ufficiale n. 152 del 30 giugno 1988). Esso dispone, per la tutela della salute pubblica e per il miglioramento delle condizioni di vita, che si possa effettuare la ricerca degli enterovirus a giudizio dell'autorità competente, mediante metodiche predisposte dall'Istituto superiore di sanità.

Il perfezionamento di tecniche di recupero di virus dall'acqua [9, 12, 15-28] e l'introduzione di tecniche sofisticate di biologia molecolare [29-41] per l'identificazione dei virus in campioni ambientali, fanno sperare in una futura applicazione di queste metodiche nel settore delle acque destinate al consumo umano. L'uso sempre crescente di metodiche PCR (polymerase chain reaction) svolge ora un ruolo decisivo nello sviluppo della diagnostica molecolare in campo ambientale. E' una tecnica di amplificazione in vitro del DNA o dell'RNA (in questo caso è detta RT-PCR) che utilizza un enzima termostabile detto "Taq-polimerasi" (Taq dal nome del bacillo termofilo *Thermus aquaticus* da cui è estratto). La scoperta di quest'enzima, avvenuta nel 1976 [42] ha dato seguito ad enormi progressi tecnologici nell'ambito della biologia molecolare di base ed in tutti i campi applicativi. La PCR fu usata per la prima volta nel 1988 per la diagnosi della β -talassemia [43] ed è adesso uno strumento importante nella ricerca di base e nella diagnostica clinica del virus dell'HIV e del citomegalovirus ed in campo clinico ed ambientale per l'identificazione di enterovirus, epatite A [44], epatite E [45], Norwalk [46] e rotavirus [47]. Altre importanti applicazioni della PCR in campo ambientale, in aggiunta a quelle citate precedentemente, riguardano la tipizzazione di ceppi tossici di *E. coli*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio vulnificus* e di batteri patogeni non coltivabili, nell'acqua (es. *Aeromonas*).

2. Cenni sui virus enterici e sulle malattie da essi causate

La virologia ambientale è nata circa 50 anni fa con il rilevamento dei poliovirus nei liquami e nell'acqua [48]. Per i primi 30 anni dopo la sua scoperta, avvenuta nel 1908, il poliovirus è stato ritenuto capace di infettare l'uomo attraverso l'apparato respiratorio, replicarsi nei bulbi olfattori e quindi attraverso le vie nervose giungere nel sistema nervoso centrale. In seguito fu scoperto nelle feci di individui affetti da paralisi e, dal 1940 in poi, viene considerato un virus enterico. Si svilupparono metodi per il rilevamento del virus nei liquami e nelle acque contaminate allo scopo di monitorarne la diffusione e distribuzione geografica. In aggiunta, grazie a tali studi, furono anche scoperti i coxsackievirus verso la fine del 1940 e più tardi gli echovirus. Epidemie attribuibili ad una loro trasmissione tramite l'acqua non erano mai state ben evidenti sebbene il rilevamento di tali virus fosse frequente in acque contaminate e nei liquami. Le prime evidenze di malattie infettive "waterborne", vale a dire dovute ad acque contaminate, si ebbero nel 1955 quando scoppiò una vasta epidemia di gastroenterite virale a Nuova Dehli in India che coinvolse circa 230.000 persone. Diversi anni dopo fu identificato il virus dell'epatite E, quale agente eziologico responsabile della malattia.

Nella stessa decade fu scoperto il virus dell'epatite A quale agente eziologico di epatiti infettive dovute al consumo di mitili crudi o inadeguatamente cotti. Dati sperimentali mostravano che i mitili, in acque contaminate da feci umane, potevano accumulare virus enterici: la più larga epidemia attribuita a tali alimenti avvenne nel 1988 a Shangai e coinvolse circa 300.000 persone. In Thailandia in ogni modo, sono state documentate epidemie di epatite A associate all'acqua da bere contaminata [49]. Sono stati scoperti in seguito virus enterici classificati come "virus della diarrea" e comprendenti: rotavirus A, B e C, adenovirus 40 e 41, astrovirus e calicivirus. La classificazione attuale dei virus enterici è quella riportata in Tabella 1. Da rilevare che l'epatite A, inizialmente considerata enterovirus 72, sulla base di analisi filogenetiche e caratteristiche funzionali viene ora universalmente considerata un genere a parte, gli eparnavirus (virus ad RNA dell'epatite A).

Merita particolare attenzione il virus di Norwalk, un virus enterico di recente caratterizzazione classificato come calicivirus e che quasi sempre è associato a malattie epidemiche trasmissibile mediante l'acqua o alimenti contaminati [16, 46]. Altri virus (es. Haway, Snow Mountain ecc), vengono inclusi tutti nel gruppo Norwalk, mentre gli SRV (Small Round Virus) nei calicivirus.

La responsabilità dei virus enterici nel causare malattie tramite l'acqua, è stata ampiamente documentata in un precedente rapporto Istisan [38]. Il WHO ha stimato che

Tabella 1. - *Classificazione e caratteristiche principali dei virus enterici responsabili di patologie associate direttamente o indirettamente all'acqua consumata.*

ENTEROVIRUS virus ad RNA monocatenario (ssRNA)	poliovirus 1-3	paralisi flaccida, meningite asettica, gastroenteriti
	coxsackievirus A	meningite asettica, congiuntivite emorragica, paralisi reversibile e irreversibile, malattie respiratorie
	coxsackievirus B	miocardite, meningoencefalite, meningite asettica, paralisi lieve, malattie respiratorie
	echovirus	meningite asettica, diarrea infantile, congiuntivite emorragiche, esantemi
	enterovirus 70	congiuntivite emorragica
	enterovirus 71	meningite asettica, paralisi flaccida, gastroenteriti
EPARNAVIRUS (ssRNA)	epatite A	epatite
CALICIVIRUS (ssRNA)	Norwalk	diarrea
	epatite E	epatite, gastroenteriti, diarrea
	diversi gruppi sierologici	diarrea
ROTA VIRUS virus a doppio filamento di RNA (dsRNA), segmentato	gruppo A	diarrea, vomito, soprattutto in bambini (winter vomiting disease)
	gruppo B	" " , soprattutto in adulti (diffusa in Cina)
	gruppo C	gastroenteriti endemiche ed epidemiche in tutti i paesi
REOVIRUS (dsRNA)	tipo 1-3	associati a varie infezioni perinatali e dell'infanzia ma senza prove certe attribuibili all'acqua consumata ; (sono costantemente rilevati nelle acque superficiali e creano seri problemi di interferenze diagnostiche).
ASTROVIRUS (ssRNA)	diversi gruppi sierologici	lievi forme di gastroenterite, soprattutto nei bambini
CORONAVIRUS (ssRNA)	diversi gruppi sierologici	infezioni del tratto respiratorio con diarrea
ADENOVIRUS virus a doppio filamento di DNA	tipo 40-41	gastroenteriti epidemiche infantili

nel 1980, 25.000 persone al giorno [50] sono morte per il consumo di acqua contaminata, e che approssimativamente l'80% di tutte le malattie del mondo sono correlabili con il consumo di acqua contaminata da materiale fecale. Nei paesi industrializzati, ove l'acqua destinata al consumo umano è sottoposta ad adeguati trattamenti, l'incidenza di tali malattie è estremamente bassa; comunque vi è una

crescente preoccupazione per l'inquinamento dei fiumi, delle acque di falda e delle acque costiere.

Le infezioni da enterovirus (oltre 140 sierotipi) nei paesi temperati avvengono soprattutto durante l'estate-autunno, mentre in quelli tropicali sono endemiche o legate alla stagione delle piogge. Le infezioni da enterovirus sono generalmente asintomatiche; di queste sono responsabili: poliovirus per il 90%, echovirus per il 5% e coxsackievirus per il 5% [51]. A proposito del poliovirus va ricordato che la forma clinica della malattia, cioè la paralisi flaccida, si manifesta solo in un numero molto ridotto rispetto alle persone infettate da virus: un caso clinico ogni 1.000/2000 soggetti infettati nei bambini di età inferiore a 5 anni, un caso clinico ogni 75 persone infettate negli adulti [52]. Gli enterovirus sono associati ad un largo spettro di malattie che vanno dalle paralisi flaccide irreversibili a forme lievi e transitorie, da disturbi dell'apparato respiratorio sino a miocarditi più o meno gravi e congiuntiviti emorragiche. Distinte sindromi cliniche possono essere associate indipendentemente a differenti tipi di enterovirus. Tali associazioni non sono sempre prevedibili, per cui un dato virus può comportarsi diversamente (clinicamente ed epidemiologicamente) in luoghi e tempi diversi. L'echovirus 9, per esempio, è stato associato primariamente alla meningite asettica [51] mentre a volte, in alcune epidemie, è stato associato a malattie esantematiche. Da sottolineare che casi di paralisi flaccida, simili a quelle provocate dal poliovirus, sono state causate dall'enterovirus 71 e dal coxsackievirus A7 [53]. Gli enterovirus hanno periodi di incubazione molto variabili, da 1 a 35 gg, in funzione del tipo di virus, dell'età del soggetto (più breve nei bambini, più lunga negli adulti), delle condizioni fisiopatologiche del soggetto (favoriscono la malattia: lo stress fisico, la malnutrizione, la gravidanza, l'immunodeficienza, la bassa copertura vaccinale, la tonsillectomia, l'ipercolesterolemia ecc.). La prevalente circolazione di forme asintomatiche rende difficile la correlazione, tra la loro presenza in acque contaminate e nell'uomo. In paesi del terzo mondo o in quelli fortemente rurali come la Cina, ove si utilizzano acque di superficie o di pozzo non trattate adeguatamente [54], la poliomielite è tuttora un grosso problema di sanità pubblica [55] mentre nei paesi ove il benessere economico permette standard igienici molto alti e si attuano massicce campagne di vaccinazione antipolio sin dagli anni sessanta, la poliomielite è stata quasi completamente eradicata; i rari casi segnalati in Italia dal 1981 al 1992 non erano associati all'acqua da bere ma ai vaccini [52]. La recente comparsa in Finlandia [56], ed Olanda [57] di casi di poliomielite nell'ambito di comunità che per motivi religiosi avevano rifiutato la vaccinazione, ha dimostrato che la presenza di potenziali ospiti umani immunologicamente non protetti in una collettività di vaccinati, è un terreno di amplificazione di ceppi selvaggi neurovirulenti che possono così diffondere e persistere nell'ambiente nonostante i poderosi sforzi di tutti i paesi di eradicarli totalmente dalla superficie del pianeta. Studi di sorveglianza epidemiologica condotti in Inghilterra [58] e USA [59] sui virus escreti da persone sane vaccinate con poliovirus vivi attenuati ne hanno rivelato l'estrema instabilità genetica in quanto essi, pochi giorni dopo la vaccinazione, durante la replicazione nell'intestino umano tendono spontaneamente a ridiventare neurovirulenti. Il fenomeno di poliomieliti d'origine idrica

può diventare un fatto importante in futuro [60], in quanto l'aumento della popolazione e la scarsità d'acqua rendono spesso necessario il riciclo di acque depurate. La notevole capacità dei virus enterici di sopravvivere a lungo nell'ambiente acquatico è soprattutto dovuto alla loro capacità di aggregarsi al particolato organico come è riportato in un significativo esempio di Tabella 2.

Tabella 2. - *Sopravvivenza in acqua dei virus enterici. La resistenza dei virus nell'acqua è notevole; il particolato organico li stabilizza in modo considerevole aumentandone di parecchio la sopravvivenza.*

VIRUS	TIPO DI AMBIENTE	DURATA	REFERENZE
poliovirus	acqua di falda	>30 gg	[61]
	acqua minerale	>1 anno a 4° C, 300 gg a t.a.	[62]
	suolo	12 gg a 37° C, 180 gg a 4° C	[61]
	acque superficiali	296 gg a 18° C, >550 gg a 4° C	[63]
	fiume , in situ :	a 23° C , presente 10% della carica virale dopo 25 h	[64]
	liquami	a 23° C, presente 90% della carica virale dopo 27 gg	[65]
	mare : senza sedimento	presente 1% carica virale dopo 1,4 gg	[13]
	" + sedimento privo di contaminazioni organiche	6 gg	"
	" + sedimento con presenza di materiale org.	>diversi anni	"
rotavirus	acqua potabile	oltre 64 gg a 4° C in presenza di cloro libero residuo fino a 0,05 mg/l	[66]
	acqua di estuario	3-14 gg a 20° C	"
epatite A	acqua minerale	≥300 gg	[62]

I sedimenti marini, aggiunti a virus sospesi in acqua di mare ne aumentano la sopravvivenza; la presenza di materiale organico di origine fecale in tali sedimenti contribuisce ad aumentare incredibilmente la sopravvivenza dei virus nell'ambiente acquatico. I processi di potabilizzazione dell'acqua da bere (al punto di messa a disposizione dell'utente si dovrebbe avere un valore di 0,2 mg/l di cloro libero) potrebbero essere talvolta inadeguati per inattivare completamente i microrganismi in essa presenti. I valori ottenuti da vari autori sono stati riportati in Tabella 3.

Tabella 3. - Valori di C.T. a 4-5°C pH 6,7 per vari patogeni. Il parametro utilizzato per l'acqua potabile e che esprime le condizioni necessarie per l'inattivazione del 99% dei patogeni da parte dei vari disinfettanti, è il C.T. (Contact Time = prodotto della concentrazione del cloro libero in mg/l per il tempo di contatto espresso in minuti);

PATOGENI	AUTORI		
	Yates (1992) [67]	Bull (1990) [50]	Hoff (1990) [68]
<i>E. coli</i>	2,5	0,034-0,05	0,034-0,05
polio 1	1,1-2,5	1,1-2,5	1,1-2,5
epatite A	1,8		
rotavirus umani	0,03		0,1-0,05
fago MS-2	0,25		
FAGO F-2		0,08-0,18	0,08-0,18
<i>giardia lamblia</i>	90-170		47-150
" <i>muris</i>			30-630
criptosporidio	18 ore		

I valori ripresi da Bull (1990) e Hoff (1990), questi ultimi riportati in un manuale edito dall'EPA, indicano che esiste la reale possibilità di sottostimare il rischio virale quando esso si desume dalla semplice (ed economica) valutazione degli indici tradizionali di misura della fecalizzazione, in pratica dalla misurazione dei coliformi. E' stato stimato sperimentalmente che il rischio di contrarre un'infezione da echovirus 6, in seguito ad un'assunzione giornaliera di circa 2 litri di acqua contenente 1 particella infettante in 1000 litri, è di 10^{-3} persone/anno e di 10^{-1} persone/durata esistenza di un individuo (70 anni). Per quanto riguarda la mortalità, la stima è $5,8 \times 10^{-6}$ /anno e di 8×10^{-5} /vita media. [50]. Secondo uno studio fatto nell'area di Montreal [69], la dose di 0.0006 virus/l riscontrata nell'acqua porterebbe ad un rischio annuale di 0,24 casi/persona anno; vale a dire equivalente ad un rischio giornaliero di 0.00082. La mortalità potenziale sarebbe di $3,2 \times 10^{-8}$ - $1,9 \times 10^{-6}$ che in un vita media di 70 anni equivarrebbe a 0,008-0,047. Dati analoghi pubblicati su riviste recensite e relativi alla situazione di rischio in Italia non ce ne sono.

3. La tecnologia PCR per l'identificazione dei virus nell'acqua

3.1. Problematiche relative all'identificazione dei virus enterici nell'acqua destinata al consumo umano.

La nostra legislazione prevede che possano esistere condizioni idrogeologiche particolari o necessità di studi retrospettivi tali da esigere misure più dirette del rischio, cioè l'individuazione di unità virali infettanti del genere enterovirus. La limitazione della normativa alla ricerca dei soli enterovirus ed al tempo stesso l'esigenza di individuare la presenza o meno di unità infettanti, pone seri problemi alla valutazione e allestimento di protocolli operativi e lascia ampi spazi discrezionali alla valutazione del significato della presenza di virus nell'acqua. I problemi sono molteplici e quelli che a nostro giudizio sono molto critici sono: a) l'estrema diluizione della carica virale nel mezzo acquatico che lascia completamente all'operatore la responsabilità di scelta sui volumi effettivi d'acqua da concentrare ai fini della valutazione dose/effetto; b) l'estrema eterogeneità degli enterovirus che rende necessario l'uso di diverse linee cellulari; c) i lunghi tempi d'attesa che spesso vanificano i risultati; d) la resistenza dei mutanti ambientali agli anticorpi neutralizzanti usati in sierologia diagnostica; e) la costante presenza dei reovirus nei campioni ambientali che rende molto probabile la possibilità di avere infezioni persistenti croniche, senza CPE, sulle cellule normalmente usate per l'isolamento degli enterovirus (BGM, Hep-2 ecc.); ciò crea seri problemi di falsi negativi mentre, al contrario, crea problemi di falsi positivi quando il CPE causato dalla sua presenza viene erroneamente attribuito ad enterovirus; f) necessità di cercare talvolta altri patogeni (es. virus dell'epatite A, epatite E, Norwalk) che sono difficili o impossibili da isolare sulle linee cellulari. L'insieme di questi problemi ha reso finora alquanto difficile, se non impossibile, la disponibilità di protocolli operativi standardizzati proponibili agli operatori periferici. I protocolli innovativi che si stanno ora usando e sperimentando ovunque, richiederanno serie *verifiche sul campo* per poterne valutare appieno l'accuratezza e la fattibilità, ma sicuramente troveranno in futuro spazio e consensi. *A completamento di protocolli diffusi con precedenti rapporti Istisan riguardanti la concentrazione e l'isolamento degli enterovirus, si riportano di seguito metodi e protocolli relativi all'esecuzione della tecnica PCR per l'identificazione degli enterovirus in campioni di acque superficiali.*

3.2. Identificazione di enterovirus mediante metodica PCR

L'esperienza conseguita negli ultimi anni nella valutazione dei parametri virologici riguardanti le acque di balneazione, ci permette di valutare più concretamente le possibilità diagnostiche che l'uso congiunto di tecnologie tradizionali - e moderne permette potenzialmente di realizzare.

Il vantaggio della PCR in termini di sensibilità e rapidità deriva essenzialmente dalla sua capacità di identificare di acidi nucleici appartenenti a particelle virali integre, indipendentemente dalla loro infettività o meno [70, 41]. Rilevare particelle virali senza poter conoscere la loro infettività limita i vantaggi del metodo ma soltanto in quei casi in cui esiste una valida alternativa diagnostica come per esempio nel caso degli enterovirus, facilmente coltivabili su monostrati di cellule di primate. In tutti gli altri casi la tecnologia PCR può dare una serie notevole di vantaggi tra cui: a) dati sullo stato di fecalizzazione dell'acqua in tempo reale; b) indicazioni più precise sui rischi per la salute umana; c) informazioni qualitative e quantitative di patogeni particolari, quali per es. il virus della epatite A, il cui isolamento sulle cellule è alquanto difficile e costoso, il virus di Norwalk per il quale non sono noti finora tecniche di isolamento su cellule, il virus dell'epatite E anch'esso difficilmente isolabile sulle cellule. Lo schema operativo riportato in Figura 1, è stato largamente sperimentato per l'identificazione di virus in acque di mare, ma può benissimo essere utilizzato per tutti i tipi di acque superficiali.

L'identificazione di virus in un campione d'acqua può essere condotta in funzione degli obiettivi, a seconda cioè che s'intendano cercare patogeni non-coltivabili o coltivabili su colture cellulari. Nel primo caso non esistono alternative all'identificazione del virus direttamente nel campione d'acqua adeguatamente concentrata; nel secondo caso, invece, e che è quello degli enterovirus, si potrebbe giungere ad un compromesso considerando due protocolli alternativi. Una volta effettuata la concentrazione, si esegue l'identificazione diretta dei virus; successivamente a seconda dei casi: A) se dovessero risultare assenti gli enterovirus si potrebbe non procedere all'isolamento di particelle infettive, B) se gli enterovirus risultassero chiaramente presenti (e ci fossero tempo e denaro a sufficienza), vuol dire che si procederà all'isolamento delle particelle infettive su colture cellulari. In quest'ultimo caso la conferma degli enterovirus, se richiesta, può essere fatta sia secondo metodiche tradizionali (sieroneutralizzazione o microscopia elettronica) sia mediante PCR. Le metodiche tradizionali richiedono preparati molto concentrati e spesso purificati: la coesistenza di reovirus nello stesso lisato rende inattendibile la sieroneutralizzazione, mentre la presenza di detriti cellulari richiede spesso di eseguire purificazioni in gradienti di saccarosio o cloruro di cesio prima di un esame al microscopio elettronico dei virus. L'esecuzione della PCR non necessita di purificazioni particolari e può dare in tempi brevi il genere di appartenenza e spesso la distinzione polio/non-polio [71].

3.2.1 Preparazione del campione biologico. - I virus sono estremamente diluiti in un campione d'acqua ed occorrono diversi passaggi per la loro concentrazione .

L'ultrafiltrazione è il primo passaggio della concentrazione delle particelle virali. Per le acque da destinare al consumo umano non esistono purtroppo indicazioni ufficiali sui volumi da esaminare. Le uniche indicazioni vengono date dall'EPA [72] e si riferiscono a volumi iniziali di 100-400 litri d'acqua. Un riferimento che ci può essere d'aiuto ci viene dalle normative italiane riguardanti le acque di balneazione, in quanto esse richiedono l'assenza di unità infettanti virali in un campione di 10 litri. Diverse ditte specializzate del settore offrono apparecchiature e protocolli adeguati per la

concentrazione di grossi volumi d'acqua. Il concentrato, generalmente dopo almeno due ultrafiltrazioni, è ridotto a volumi molto piccoli, generalmente 40-50 ml [22]. Si procede al pellettaggio delle particelle virali secondo lo schema di Figura 1.

L'ultracentrifugazione di un campione concentrato d'acqua permette di concentrare ulteriormente le particelle virali in un volume ridottissimo. L'altissima velocità necessaria richiede generalmente l'uso di rotori angolari. Tali rotori richiedono tubi monouso ben equilibrati che vanno centrifugati dopo opportuna chiusura ermetica (una speciale saldatura). Questa operazione è alquanto scomoda e pericolosa, soprattutto quando si manipolano campioni contenenti virus. Noi consigliamo l'uso di tubi riusabili da 38,5 ml in policarbonato (Kontron Instruments, Milano, cat. 9091-90236) dotati di coperchi metallici (Kontron cat. 9096-00130). Questi tubi possono essere riempiti e svuotati senza problemi sotto cappa di sicurezza biohazard. Questo passaggio produce un pellet contenente particelle virali integre e capsidi vuoti mentre l'RNA proveniente da virus degradati non sedimenta in queste condizioni e viene scartato con il supernatante. Il pellet che si ottiene si risospende in un piccolo volume d'acqua e si procede all'estrazione dell'RNA. Ovviamente, prima di procedere all'estrazione dell'RNA occorre preparare tutte le soluzioni necessarie come indicato in Tabella 4. L'estrazione dell'RNA può presentare diversi problemi a causa della presenza di acidi umici che inibiscono il saggio enzimatico, o di endonucleasi di origine batterica che degradano l'RNA. Il nostro protocollo di estrazione dell'RNA (Tabella 5) è stato testato su pellet ottenuti da campioni di acque di mare con o senza preventivo trattamento su colonnine da 1 ml di Sephadex G-200 equilibrate in tampone (Tris 50 mM, Tween 20, 0.2% pH 9) e centrifugate a 1800xg per 15'. E' riportato che esse rimuovono efficientemente gli inibitori [73]. Le prove di laboratorio non hanno evidenziato differenze apprezzabili nelle rese delle PCR rispettivamente da pellet passati e non passati su colonna, e quindi di solito l'uso di tali colonnine per rimuovere gli inibitori, indispensabili quando si concentrano i virus da liquami, non viene effettuato. L'RNA, una volta estratto, occorre usarlo subito altrimenti si degrada.

Questo è uno dei motivi principali per cui le PCR spesso sono negative. Qualora occorresse ripetere gli esperimenti a distanza di tempo, oppure si dovessero conservare aliquote di campione per successive analisi di conferma, occorrerà riprecipitare l'RNA residuo con 1/10 di volume di NaAcetato, pH 5.2, 3.3 M ed 1 volume di isopropanolo freddo (-20°C) e conservare a -80°C. L'RNA denaturato in questo modo si conserva anche per anni. In acqua invece, anche se trattata con il DEPC allo 0.1%, l'RNA virale si degrada facilmente analogamente all'RNA messaggero eucariotico.

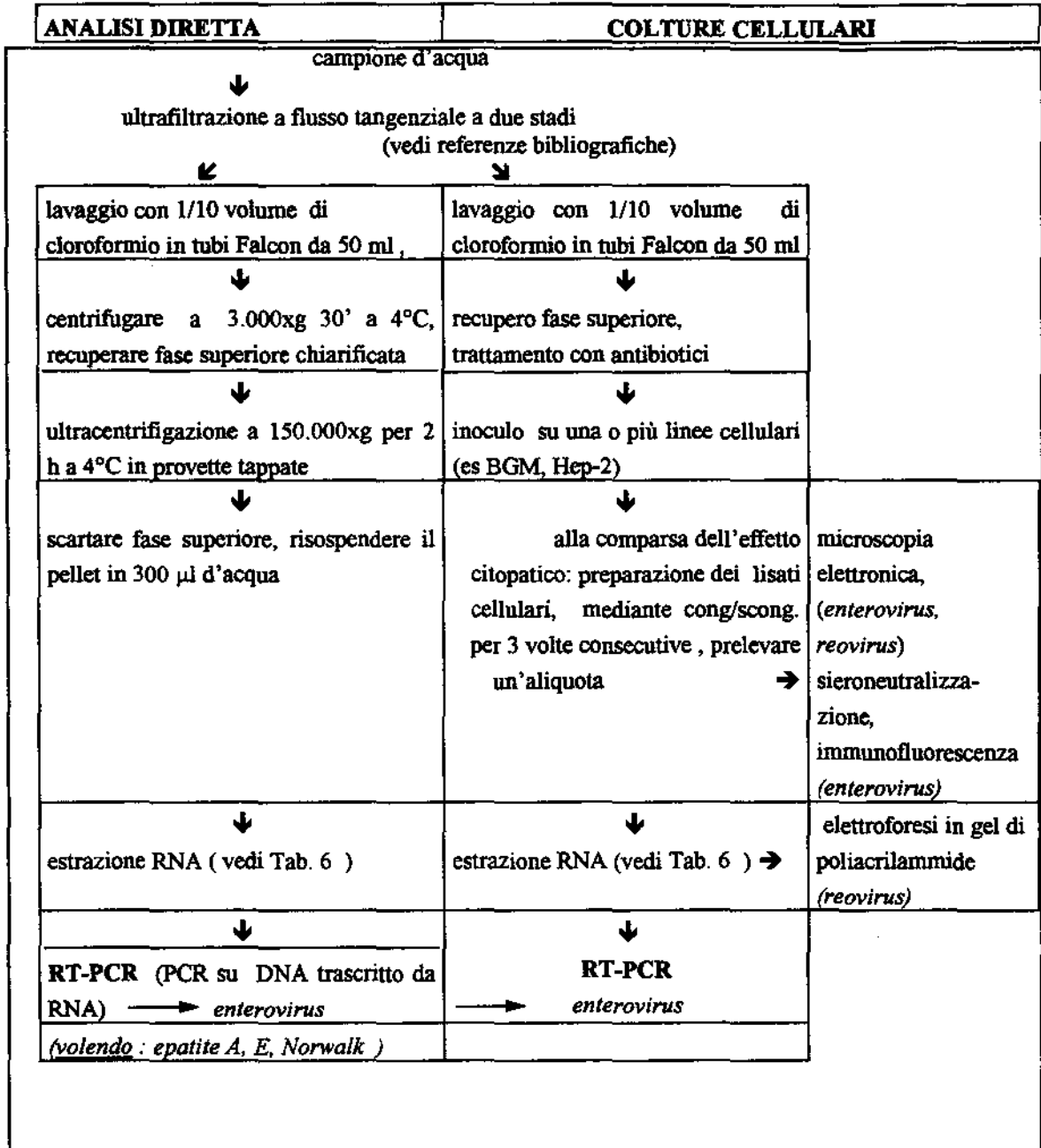


Figura 1. - I passaggi necessari all'identificazione diretta dei virus dopo concentrazione del campione originario d'acqua, sono schematizzati parallelamente a quelli da effettuare per identificare i virus amplificati su colture cellulari. L'amplificazione sulle colture permette di ottenere informazioni sulla infettività delle particelle e la possibilità di integrare i dati con la microscopia elettronica, la sieroneutralizzazione e l'elettroforesi dell'RNA. La PCR diretta è utile per ottenere dati preliminari, nonché l'unica alternativa per l'identificazione diretta di virus patogeni non coltivabili.

Fa eccezione l'RNA dei reovirus, che è a doppio filamento ed è resistentissimo alle endonucleasi batteriche. Particolare cura occorre nella preparazione del fenolo. Esistono numerosi protocolli, alcuni alquanto poco pratici. L'idrossichinolina non è strettamente necessaria ma è utilissima: questo composto oltre ad essere un antiossidante del fenolo, impartisce alle sue soluzioni un caratteristico colore giallo che permette di distinguere comodamente le fasi. Occorre fare attenzione a non versare gli scarti nel lavandino del laboratorio ma raccogliarli diligentemente in appositi recipienti tappati e smaltirli successivamente mediante appositi vettori autorizzati. La manipolazione del fenolo rende indispensabile l'uso di cappe adeguate (Biochimiche/biohazard). La stessa

Tabella 4. - Soluzioni necessarie per il trattamento dei virus con proteinase K e successiva estrazione dell'RNA.

<p>Tris 1M, pH 7.5 [tris(idrossimetil) aminometano] (PM= 121.14)</p> <p>pesare Tris 12.14 g sciogliere con acqua 80 ml</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ sciogliere a caldo sotto agitazione, poi raffreddare brevemente in ghiaccio fino a circa 25°C, ■ aggiungere sotto agitazione 5 ml di HCl fumante, controllare il pH, raffreddare in ghiaccio fino a 25°C, ricontrollare il pH e aggiungere eventualmente altro HCl, ■ portare a volume di 100 ml con acqua in cilindro graduato, ■ autoclavare a 121°C 15' o, se si ha fretta, filtrare su Nalgene da 0.45 µm., ■ preparare con lo stesso procedimento, 1 litro di Tris 1M, pH 8. 	<p>EDTA(.2Na) 0.5M, pH 8 (etilendiamminotetracetato di sodio) (PM=372.2)</p> <p>pesare EDTA 18.6 g sciogliere con acqua 70 ml</p> <p>pesare NaOH gocce 2 g</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ mettere sotto agitazione continua fino a quando tutto l'NaOH si è sciolto, ■ misurare il pH e portare a pH 8 con NaOH 10N (l'EDTA si scioglie completamente soltanto a pH= 8), ■ portare a volume di 100 ml con acqua in un cilindro, ■ autoclavare o, se si ha fretta, filtrare su Nalgene da 0.45 µm.
<p>NaCl 5M (cloruro di sodio , PM=58.44))</p> <p>Pesare NaCl 29.22 g sciogliere con acqua 90 ml</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ sciogliere a caldo sotto agitazione continua, poi portare a t.a. e quindi a 100 ml in cilindro da 100 ml, ■ autoclavare, o, se si ha fretta, filtrare su Nalgene da 0.45µm. 	<p>Proteinase K (Boheringer Mannheim) Soluzione stock = 20 mg/ml di acqua :</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ si scioglie l'intero contenuto di una confezione (25 mg) con acqua sterile (1,25 ml) e si dispensa in aliquote da 100 µl, ■ si conserva a -20° C. (Scartare gli avanzi una volta scongelata l'aliquota), ■ Usare 10-20 µl/saggio

Tabella 4. - Continua.

<p>SDS 10% (sodio dodecil solfato)</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Pesare 2 g in carta argentata, trasferirla in becker da 50 ml, ■ aggiungere 20 ml di acqua, scaldare in forno Microonde per 0.5-1' poi sciogliere completamente con agitatore magnetico, ■ sterilizzare soltanto su Nalgene. 	<p>FENOLO</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ pesare 500 mg di idrossichinolina (0.1% fenolo) e trasferire in una confezione nuova di fenolo solido da 500 g. ■ fondere il solido, nella stesso contenitore in cui è fornito, in bagnomaria a 70-80° C, agitando la bottiglia di tanto in tanto, ■ aggiungere 500 ml di acqua alla stessa temperatura, agitare, lasciare raffreddare, quindi tenere in frigo, ■ Al momento dell'uso, prelevare 25 ml della fase inferiore e trasferirla in tubi Falcon da 50 ml, aggiungere 25 ml di Tris 1M, pH8, agitare per capovolgimento, poi centrifugare per 15' a 4000xg in modo da separare le fasi, ■ scartare la fase superiore in un apposito recipiente di raccolta, ■ aggiungere 1 volume di Tris 0.1M ,pH8, agitare c.s. e ricentrifugare, ■ scartare la fase superiore, rimettere 1 volume di Tris 0,1M e ricentrifugare. Conservare in frigo la provetta avvolta in carta stagnola.
<p>TAMPONE DI LISI SENZA SDS</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Tris 1M, pH 7.5 20 ml ■ EDTA 0.5M, pH 8 5 ml ■ NaCl 5M 6 ml <p>fare aliquote da 6 ml e conservare a -20°C.</p>	<p>TAMPONE FINALE DI LISI : (4xTFL)</p> <p>Miscelare, al momento dell'uso :</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 6 ml soluzione di lisi senza SDS,; ■ 4 ml di SDS al 10% in acqua
<p>DEPC 0,1% (diethylpirocarbonato)</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ trasferire 1 ml di DEPC in 1000 ml di acqua in beuta da 2 litri e tenere sotto agitazione per tutta la notte, ■ autoclavare 15-20 min a 121° C, ■ dispensare in aliquote. 	<p>NaAcetato, pH 5.2, 3.3 M (PM= 82.035)</p> <p>pesare Acetato anidro 27.069 g sciogliere con acqua 60 ml aggiungere Acido acetico glaciale 18-20 ml ,</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ misurare il pH, portare a volume di 100 ml con acqua, ■ autoclavare

raccomandazione viene fatta per quanto riguarda l'uso del DEPC che è un pericoloso carcinogeno e va trattato sotto cappa chimica. La conservazione del prodotto puro in

normali frigoriferi deve essere evitata in quanto il DEPC si degrada spontaneamente ad anidride carbonica ed alcol etilico che potrebbero provocare lo scoppio della confezione. L'autoclavazione delle soluzioni acquose decompone il DEPC riducendone la tossicità ; tale operazione non va mai fatta in presenza di Tris [42].

La miscela d'incubazione finale viene preparata in provette Eppendorf da 1,5 ml munite di chiusura di sicurezza, ove vengono dispensati tutti i reagenti ed i campioni utilizzando pipette automatiche e puntali monouso autoclavati (a 121°C per 15') :

Tabella 5. - Protocollo per l'estrazione dell'RNA da una sospensione di particelle virali

- miscelare 300 µl campione in acqua + 100 µl 4xTFL + 10 µl ProteinaseK, in provettine Eppendorf da 1,5 ml con il tampone di lisi come indicato in Tabella 4,
- lasciare incubare a 37°C per 1 ora, quindi bloccare in ghiaccio,
- dispensare 450 µl fenolo equilibrato preparato come descritto in Tab. 1, agitare bene, quindi centrifugare per 5' a 15.000 xg a 4°C,
- prelevare 400 µl circa di supernatante (fino all'interfacie senza prelevare la fase inferiore che contiene il fenolo) e trasferire in tubi puliti,
- aggiungere un pari volume di Cloroformio :Alcol isoamilico (24 :1), agitare e ricentrifugare come sopra,
- prelevare 350 µl circa di supernatante (fino all'interfacie senza prelevare la fase inferiore organica) e trasferire in altre Eppendorf,
- precipitare infine l'RNA aggiungendo :
1/10 V/V di acetato di sodio 3.3M pH 5,2 + 1 volume di isopropanolo freddo e lasciare a -20°C tutta la notte oppure, se si ha fretta, 30' a -80°C.
centrifugare a 0°C a 15.000 rpm per 30',
- scartare il supernatante per capovolgimento,
- lavare il pellet aggiungendo 400 µl di etanolo 80% freddo (-20°C) ,
- ricentrifugare come sopra, scartare il supernatante (non completamente per evitare di aspirare il precipitato).
- asciugare il precipitato sotto cappa sterile o in appositi evaporatori centrifughi,
- riprendere il pellet con 20 µl di H₂O 0.1% DEPC subito prima dell'uso, altrimenti conservare l'RNA precipitato come sopra descritto.
- diluire 2 µl di questa soluzione in 18 µl di acqua ed effettuare la PCR su 2 µl di soluzione (Tab 8)

Attualmente abbiamo reso più pratico il protocollo di estrazione dell' RNA precedentemente messo a punto [33] ma che è rimasto comunque sostanzialmente lo stesso; si procede quindi come schematizzato in Tabella 5.

I *primer* da utilizzare per la ricerca degli enterovirus sono riportati in Tabella 6. Le loro caratteristiche sono state descritte in precedenza [37, 38]; essi sono tuttora usati per valutarne appieno le potenzialità e limiti. Le condizioni di reazione in cui vengono utilizzati hanno specificità di gruppo e quindi potrebbero dar luogo a falsi positivi. Nella nostra esperienza abbiamo notato che i falsi positivi sono generalmente dovuti a contaminazioni delle miscele di reazione da parte di aerosol generati da PCR eseguite in precedenza nello stesso ambiente ove si prepara la miscela di reazione; in tutti gli altri casi essi non hanno mai amplificato virus al di fuori di membri appartenenti agli enterovirus.

Tabella 6. - *Primer universali per gli enterovirus. In grassetto i siti di restrizione per gli enzimi BamHI (GGATCC) e HindIII. (AAGCTT).*

DESCRIZIONE	FORMULA	POSIZIONI	REFERENZE
+EV B-436	5'-TTGA GGATCC TCCGGCCCTGAATGCGGCT	(436-465)	[73]
-EV H-603	ATCT AAGCTT GTCACCATAAGCAGCCA	(577-603)	"

3.3.3 Trascrizione inversa dell'RNA e PCR. - L'enzima *Taq polimerasi* usato tradizionalmente nelle reazioni PCR non agisce direttamente sull'RNA, ma soltanto sul DNA. Occorre quindi l'uso di un altro enzima, la *trascrittasi inversa* che permette la sintesi del primo filamento di DNA (cDNA) che costituisce lo stampo necessario all'azione della *Taq*. Le due reazioni avvengono in condizioni di forza ionica e temperatura differenti e, per ottenere rese ottimali, le due fasi si eseguono separatamente (Tabelle 7 e 8). Tale procedura comporta l'apertura delle provette tra una reazione e l'altra per cui spesso questa operazione è causa di contaminazione dei campioni. Una modifica in tal senso della metodica ora descritta è in fase di sperimentazione per ottimizzarne le rese e verificarne la specificità e raggio d'azione. E' infatti possibile effettuare le due reazioni nello stesso tubo pipettando tutti i reattivi sin dall'inizio. E' buona norma, comunque, adottare parecchie precauzioni per evitare contaminazioni da parte degli aerosol che si generano durante la fase di reazione ad esempio: l'uso di puntali sterili muniti di filtro in cotone e di pipette automatiche riservate per le varie fasi della PCR, la separazione fisica degli ambienti in cui si effettuano le varie operazioni e la riduzione al minimo indispensabile delle operazioni di pipettaggio dei reagenti, sono tutti accorgimenti obbligatori che riducono al minimo le possibilità di ottenere artefatti [74].

La corsa viene effettuata per 30'a 80 V e 1 h a 120 V in tampone TBE 1x in

presenza di bromuro d'etidio 0,5 µg/ml (Tabella 9). Parallelamente ai campioni si effettua la corsa di un marker di pesi molecolari. Noi abbiamo trovato molto comodo usare il marker 1Kb DNA ladder (circa 1 µg /pozzetto) della Gibco -BRL [75], trattato come il campione. La reazione è positiva per enterovirus quando si evidenzia una netta banda situata tra i marker molecolari compresi rispettivamente tra 154 e 201 bp [37, 38, 75]. L'evidenziazione delle bande si fa su un transilluminatore UV a 310 nm. La fotografia mediante macchina polaroid (Polaroid CU-5) della piastra illuminata permette di registrare l'esperimento per future verifiche e controlli.

Tuttavia, a causa della resa non sempre ottimale della trascrizione inversa, o della presenza di inibitori naturali nel campione di partenza, la sensibilità del metodo può

Tabella 7. - Trascrizione inversa dell'RNA : occorre preparare una "master mix" di reagenti prima di aggiungere il campione. La miscela di reazione viene protetta da una goccia d'olio minerale per evitare l'evaporazione dell'acqua durante la fase di denaturazione. L'uso dell'olio non è necessario con incubatori aventi il coperchio termostato.

	REAGENTI	CONCENTRAZIONE dei reagenti prima dell'uso	volume x1 campione
1	MgCl ₂	25 mM	4 µl
2	tampone 10xPCR	500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8.3	2 µl
3	acqua (sterile)		1 µl
4	dGTP	10 mM,	2 µl
5	dATP	"	2 µl
6	dCTP	"	2 µl
7	dTTP	"	2 µl
8	1° primer	22 picomoli/µl di <i>EV_H-603</i>	1 µl
9	RNase inhibitor	20 U/µl	1 µl
10	Reverse transcriptase	50 U/µl	1 µl

■ miscelare bene, cambiare stanza e, sotto cappa ad UV, pipettare 2 µl di campione,
 ■ aggiungere una goccia d'olio minerale, miscelare, centrifugare brevemente, incubare a 42°C per 45', 95° per 5', portare infine a 4°C.

Tabella 8. - La PCR vera e propria viene eseguita a partire dal 1° filamento di DNA copiato dall'RNA. Nella stessa provetta di reazione si introduce sotto l'olio una seconda "master mix" contenente i necessari reagenti. Questa operazione deve essere effettuata in un'altra stanza del laboratorio e possibilmente sotto cappa speciale per PCR.

	REAGENTI	CONCENTRAZIONE dei reagenti prima dell'uso	volume x1 campione
1	MgCl ₂	25 mM	4 µl
2	tampone 10xPCR	500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8.3	8 µl
3	2° primer	" EV,B-436	"
4	acqua		65.5 µl
12	AmpliTaq-DNA polymerase	5 U/µl	0.5 µl
1 ciclo 95° C 2 min (denaturazione) 45° C 1 min (ibridazione) 60° C 1 min (estensione) 35 cicli 95° C 1 min (denaturazione) 45° C 1 min (ibridazione) 60° C 1 min (estensione) 1 ciclo 60° C 10 min (estensione) terminare a 4° C (mantenimento)			

Tabella 9. - Materiale occorrente per eseguire l'elettroforesi dei prodotti della PCR.

Tampone TBE 10x: 1 L Tris 108 g Acido borico 55 g EDTA 0.5M, pH,8 40 ml Acqua 800 ml ■ sciogliere a caldo, poi portare a volume di 1L, ■ autoclavare.	Gel d'agarosio. La quantità da preparare varia in funzione dello stampo da utilizzare. La composizione percentuale per l'evidenziazione di segmenti di DNA intorno a 170 bp è : Agarosio 2 g TBE 10x 10 ml bromuro d'etidio (10 mg/ml) 5 µl H ₂ O fino a 100 ml ■ sciogliere l'agar per ebollizione, ■ raffreddare a 65° C in bagnomaria, ■ versare nello stampo e lasciare solidificare a t.a.
Tampone TBE 1x per l'elettroforesi : TBE 10x 100 ml bromuro d'etidio 10mg/ml 50 µl acqua fino a 1000 ml	Miscelazione del campione da caricare : ■ 1 volume campione (20-40 µl) + ■ 1/10 volume finale tampone TBE 10x + ■ 1/10 volume finale di tampone di caricamento 10x + ■ H ₂ O fino a volume finale desiderato
Tampone di caricamento 10x: ■ Sol. A : blu di bromofenolo 5 g /100 ml metanolo 10%, ■ Sol. B : cianolo di xylene 5 g /100 ml metanolo 10%, ■ Sol. C : sciogliere 25 g di Ficoll -400 in 90 ml di acqua : ■ MISCELARE : C + 5ml A + 5 ml B ■ Dividere in aliquote e conservare a -20°C.	

essere limitata; per questo può essere necessario ricorrere a tecniche di potenziamento della PCR dette seminested o nested PCR oppure sistemi di rilevamento finale basati su ibridazione con sonde marcate radioattivamente. Il nostro sistema di potenziamento è basato sul clonaggio dell' amplicone (nome del DNA generato dalla PCR) in appositi vettori plasmidici e successiva amplificazione in batteri competenti. In seguito l'analisi delle sequenze nucleotidiche permetterà di identificare il patogeno mediante ricerche di omologie in banche dati permettendoci talvolta di ricostruire l'origine e la diffusione dell'inquinamento in corso. Diversi sono i problemi posti dall'uso della PCR. L'elevatissima sensibilità della *Taq* polimerasi può provocare contaminazioni tali da creare seri problemi di false positività. Per evitare ciò occorre osservare precise norme di laboratorio che prevedono la preparazione delle miscele e la manipolazione dei campioni e degli amplificati in ambienti fisicamente separati, con strumenti di uso esclusivo e sotto la protezione di cappe a circolazione d'aria trattata ai raggi UV. Si sottolinea comunque, che approcci analitici multipli sono la sola via possibile per ottenere risposte attendibili in modo da separare i fatti dagli artefatti.

4. CONSIDERAZIONI FINALI E COMMENTO

La domanda che tutti si pongono ed a cui è difficile dare una risposta esatta è quanto si rischia effettivamente a causa di virus enterici presenti in acque destinate al consumo umano o ad attività ricreative. E' difficile predire tempi, luoghi, modalità e natura di nuove epidemie. Il livello di difesa immunologica della popolazione verso la maggior parte dei virus enterici, conseguito per vie naturali o tramite massicce campagne di vaccinazione con virus attenuati vivi (es. poliovirus Sabin) rende molto basso il rischio di contrarre malattie. Si potrebbero comunque ipotizzare due tipi di rischi. Il primo è legato all'introduzione di nuovi ospiti per il virus, umani od animali immunologicamente vergini, in un'area ove esso è endemico. Il secondo emerge dalla potenzialità evolutiva caratteristica di tutti i virus ad RNA. Nuove sequenze di virus originano gradualmente e continuamente e vengono presto o tardi sostituiti da mutanti ancora più nuovi attraverso un processo senza limiti [76]. Per esempio, le mutazioni genomiche durante la replicazione dei virus ad RNA introducono errori nel codice genetico degli enterovirus ad una velocità stimata in 10^{-2} - 10^{-3} basi/anno (per gli eucarioti 10^{-9}) per sito similmente ad altri virus ad RNA come per es. virus dell'influenza, HIV, Moloney ecc.

Cioè l'orologio molecolare che controlla la capacità evolutiva di questi microparassiti gira ad una velocità estremamente più alta di quello dei loro ospiti! La miglior difesa, dunque, è la sorveglianza epidemiologica delle forme virali circolanti nell'ambiente ove essi possono essere trasmessi e diffusi senza limiti.

Il rilevamento e l'identificazione di virus enterici in matrici di provenienza ambientale è estremamente difficile. Tecniche diagnostiche molto sensibili basate sulla PCR e

l'analisi delle sequenze geniche dei prodotti generati dalla PCR stanno conquistando l'interesse sempre crescente di tutti i ricercatori in tutti i campi sociali e scientifici.

Molto lavoro è stato fatto ma occorrerà ancora molto tempo prima che tale tecnica sia fatta propria da tutti gli operatori interessati.

BIBLIOGRAFIA

1. GERBA, C.P., GOYAL, S.M. Enteric virus: risk assesment of ocean disposal of sewage sludge. *Wat. Sci. Technol.* 1989, 20: 25-31.
2. GRAHAM, D.Y., DUFOUR, G.R., ESTES, M.K., HURST, C.J., GOYKE, T. Stability of viruses in waste water sludge eluates. *Can. J. Microbiol.* 1986, 32: 649-653.
3. LEGUYADER, F., MENARD, D., POMMEPUY, M., KOPECKA, H. Use of RT seminested PCR to asses viral contamination in Caribbean rivers (Martinique). *Wat. Sci. Technol.* 1995, 31: 391-394.
4. MATSUURA, K., HASEGAWA, S., NAKAYAMA, T., MORITA, O., UETAKE, H. Viral pollution of the rivers in Toyama City. *Microbiol. Immunol.* 1984, 28: 575-588.
5. KESWICK, B.H., GERBA, C.P., DUPONT, H.L., ROSE, J.B. Detection of enteric viruses in treated drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984, 47: 1290-1294.
6. KESWICK, B.H., GERBA, C.P., GOYAL, S.M. Occurrence of enteroviruses in community swimming pools. *Am. J. Public Health* 1981, 71: 1026-1030.
7. ROSE, J.B., MULLINAX, R.L., SINGH, S.N., YATES, M.V., GERBA, C. Occurrence of rotaviruses and enteroviruses in recreational waters of Oak Creek, Arizona. *Wat. Res.* 1987, 21: 1375-1381.
8. AULICINO, F.A., PATTI, A.M., MUSCILLO, M., GABRIELI, R., DE FILIPPIS, P., ORSINI, P., MERLONI, R., VOLTERRA, L. Viruses in marine waters. *L'Igiene Moderna* 1991a, 96: 583-592
9. AULICINO, F.A., VOLTERRA, L., MUSCILLO, M., BELLUCCI, C., ORSINI, P., MANCINI, L., PATTI, A.M., SANTI, A.L., MASTROENI, I., FLOCCIA, M., ERROI, D., PIACENTI, E., MODESTI, V., VISTOLI, R. Bacteriological and virological analyses of marine and estuarine waters along the Tyrrhenian coast. *Ann. Ig.* 1992, 4: 383-394.
10. HUGHES, M.S., COYLE, P.V., CONNOLLY, J.H. Enteroviruses in recreational waters of Northern Ireland. *Epidemiol. Infect.* 1992, 108: 529-536.
11. REYNOLDS, K.A., GERBA, C.P., PEPPER, I.L. Detection of enteroviruses in marine waters by direct RT-PCR and Cell culture. *Water Sci. Technol.* 1995, 31:323-328.
12. PATTI, A.M., AULICINO, F.A., SANTI, A.L., MUSCILLO, M., ORSINI, P., BELLUCCI, C., LA ROSA, G., MASTROENI, I., VOLTERRA, L. Enteric virus pollution of Tyrrhenian areas. *Water Air Soil Poll.* 1996, 86: 1-10.
13. LABELLE, R.L., GERBA, C.P. Influence of estuarine sediment on virus survival under field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980, 39: 749-755.
14. MELNICK, J.L. Etiological agents and their potential for causing waterborne virus diseases. In: *Viruses in the water environment: a review*. Karger Basel, (ed) Monogr. Virol. 1984, 15: 1-16.
15. HILL, W.F. Jr., JAKUBOWSKI, W., AKIN, E.W., CLARKE, N.A. Detection of virus in water: sensitivity of the tentative standard method for drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1976, 31: 254-261.
16. MCANULTY, J.M., RUBIN, G.L., CARVAN, C.T., HUNTLEY, E.J., GROHMANN, G., HUNTER, R. An outbreak of Norwalk-like gastroenteritis associated with contaminated drinking water at a caravan park. *Aust. J. Public Health* 1993, 17: 36-41.
17. SOBSEY, M.D., WALLIS, C., MELNICK, J.L. Studies on the survival and fate of enteroviruses in an experimental mode of a municipal solid waste landfill and leachate. *Appl. Microbiol.* 1975,

- 30: 565-574.
18. SOBSEY, M.D., GERBA, C.P., WALLIS, C., MELNICK, J.L. Concentration of enteroviruses from large volumes of turbid estuary water. *Can. J. Microbiol.* 1977, 23: 770-778.
 19. SOBSEY, M.D., JONES, B.L. Concentration of poliovirus from tap water using positively charge microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979, 37: 588-595.
 20. SOBSEY, M.D., GLASS, J.S. Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980, 40: 201-210.
 21. SOBSEY, M.D., GLASS J. S. Influence of water quality on enteric virus concentration by microporous filter methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984, 47: 956-960.
 22. AULICINO, F.A., VOLTERRA, L. Metodica per il rilevamento di enterovirus nelle acque destinate alla balneazione. In: *Virus enterici nelle acque: epidemiologia e tecniche di isolamento e identificazione*, a cura di Aulicino F.A., Muscillo M., Patti A.M., Orsini P., Volterra L. Istituto Superiore di Sanità, Roma, 1991 (Rapporti ISTISAN 91/26), p. 128-141.
 23. AULICINO, F.A., PATTI, A.M., ORSINI, P., VOLTERRA, L., MUSCILLO, M. Concentrazione e recupero di enterovirus da campioni di acqua di mare: ultrafiltrazione a flusso tangenziale. *Ann. Ig.* 1994, 100: 1416-1432.
 24. AULICINO, F.A., MAROSSO, L., ORSINI, P., MUSCILLO, M., BELLUCCI, C., LA ROSA, G., VOLTERRA, L. Gli apporti costieri e le acque lacustri. *Ann. Ig.* 1994, 5: 429-437.
 25. BERMAN, D., ROHR, M.E., AND SAFFERMAN, R. Concentration of poliovirus in water by molecular filtration. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980, 40: 426-428.
 26. DIVIZIA, M., SANTI, A.L., PANA', A. Ultrafiltration: an efficient second step for hepatitis A virus and poliovirus concentration. *J. Virol. Methods* 1989, 23: 55-62.
 27. CARDUCCI, A., CANTIANI, L., RUSCHI, M.A. Contributo alla standardizzazione di metodiche per la concentrazione di enterovirus da acque di mare. *L'Igiene Moderna* 1994, 101: 707-721.
 28. CARDUCCI, A., ARRIGHI, S., RUSCHI, M.A. Detection of coliphages and enteroviruses in sewage and aerosol from an activated sludge treatment plant. *Lett. Appl. Microbiol.* 1995, 21: 207-209.
 29. ATMAR, R.L., METCALF, T.G., NEIL, F.H., ESTES, M. K. Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59: 631-635.
 30. KOPECKA, H., DUBROU, S., PREVOT, J., MARECHAL, J., LOPEZ-PILA, J.M. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59: 1213-1219.
 31. STRAUB, T.M., PEPPER, I.L., ABBASZADEGAN, M., GERBA, C.P. A method to detect enteroviruses in sewage sludge-amended soil using the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60: 1014-1017.
 32. MUSCILLO, M. Le sonde molecolari e loro uso per la identificazione dei virus. In: *Virus enterici nelle acque: epidemiologia e tecniche di isolamento e identificazione*, a cura di Aulicino F.A., Muscillo M., Patti A.M., Orsini P., Volterra L. Istituto Superiore di Sanità, Roma, 1991 (Rapporti ISTISAN 91/26), p. 94- 127.
 33. MUSCILLO, M., AULICINO, F. A., ORSINI, P., BELLUCCI, C., LA ROSA, G., VOLTERRA L. Standardizzazione di un metodo "dot-blot" per l'identificazione molecolare di enterovirus in campioni ambientali mediante cDNA sonde. *Ann. Ig.* 1992, 4: 255-261.
 34. MUSCILLO, M. Metodi di identificazione di virus enterici in campioni ambientali. In: *La ricerca dei virus enterici nelle acque e in varie matrici ambientali*. A cura di Aulicino F.A., Orsini P., Volterra L e Muscillo M. Istituto Superiore di sanità, Roma, 1993 (Rapporti Istisan 93/20), pp 125-141.
 35. MUSCILLO, M., AULICINO, F. A., PATTI, A. M., ORSINI, P., VOLTERRA, L., FARA, G. M. Molecular techniques for the identification of enteric viruses in marine waters. *Wat. Res.* 1994a, 28: 1-7.
 36. MUSCILLO, M., LA ROSA, G. Caratterizzazione elettroforetica di reovirus in lisati cellulari. *L'Igiene Moderna* 1994b, 102: 717-728.

37. MUSCILLO, M.. Opportunità della identificazione dei virus enterici per una corretta interpretazione sanitaria. In: *Acque potabili- I problemi microbiologici emergenti Parte II. Quaderni di tecniche di protezione ambientale*. A. Zavatti (ed.) Pitagora Editrice Bologna, 1995a, 44 : p. 67-89.
38. MUSCILLO, M., LA ROSA, G. Rapporto sulle malattie infettive di origine idrica. La reazione di polimerizzazione a catena per l'identificazione dei virus enterici nell'acqua. *Rapporti Istisan* 95/33 1995b, 74 p.
39. TSAY, Y.L., SOBSEY, M.D., SANGERMANO, L.R., PALMER, C.J. Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59: 3488-3491.
40. TSAY, Y.L., TRAN, B., SANGERMANO, L.R., PALMER, C.J. Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60: 2400-2407.
41. TSAY, Y.L., TRAN, B., PALMER, C.J. Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61: 363-366.
42. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T. (eds) 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd ed.
43. SAIKI, R.F., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230: 1350-1354.
44. MORACE, G., PISANI, G., DIVIZIA, M., PANA', A. Detection of hepatitis A virus in concentrated river water by polymerase chain reaction. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed* 1993, 193: 521-527.
45. McCAUSTLAND, K.A., SHENGLI, B.L., PURDY, M.A., BRADLEY, D.W. Application of two RNA extraction methods prior to amplification of hepatitis E virus nucleic acid by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 1991, 35: 331-342.
46. KHAN, A.S., MOE, C.L., GLASS, R.I., MONROE, S.S., ESTES, M.K., CHAPMAN, L.E., JIANG, X., HUMPHREY, C., PON, E., ISKANDER, J.K., SCHONBERGER, L.B. Norwalk virus-associated gastroenteritis traced to ice consumption aboard a cruise ship in Hawaii: comparison and application of molecular method-based assays. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32: 318-322.
47. FIELDING, P.A., LAMBDEN, P.R., CAUL, E.O., CLARKE, I.N. Molecular characterization of the outer capsid spike protein (VP4) gene from human group C rotavirus. *Virology* 1994, 204: 442-446.
48. METCALF, T.G., MELNICK, J.L., ESTES, M.K. Environmental virology : from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology - A trip of over 50 years. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995, 49: 461-487.
49. LUKSAMJARULKUL, P., PUMSUWAN, V., PUNGCHITTON, S. Microbiological quality of drinking water and using water of Chao Phya community, Bangkok. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1994, 25: 633-637.
50. BULL, R.J., GERBA, C., TRUSSEL, R.R. Risks from waterborne infectious disease. *CRC. Crit. Rev. Environ. Control.* 1990, 20: 77-113.
51. BELSHE, R.B. *Textbook of Human Virology*. 2nd Ed. A Year Medical Book publisher, Mosby-Year Book, Inc., 1991. 1064 p.
52. GEDDES, M. *La salute degli italiani* . Rapporto CISM 1993 a cura di M. Geddes. La Nuova Italia Scientifica 1993. 366 p.
53. DIETZ, V., ANDRUS, J., OLIVE, J.M., COCHI, S., DE QUADROS, C. Epidemiology and clinical characteristics of acute flaccid paralysis associated with non-polio enterovirus isolation : the experience in the Americas. *Bull. WHO* 1955, 73: 597-603.
54. WANG, ZS., SHEPARD, D.S., ZHU, Y.C., CASH, R.A., ZHAO, R.J., ZHU, Z.X., SHEN, F.M. Reduction of enteric infectious disease in rural China by providing deep-well tap water. *Bull. WHO.* 1989, 67: 171-180.

55. ZHENG, D.P., ZHANG, L.B., FANG, Z.Y., YANG, C.F., MULDER, M., PALLANSCH, M.A., KEW, O.M. Distribution of wild type 1 poliovirus genotypes in China. *J. Infect. Dis.* 1993, 168: 1361-1367.
56. OOSTVOGEL, P.M., VAN WIJNGAARDEN, J.K., VAN DER AVOORT H.G.A.M., CONYN-VAN SPAENDONCK, M.A.E., RUMKE, H.C., VAN STEENIS, G., VAN LOON, A.M. Poliomyelitis outbreak in an unvaccinated community in the Netherlands, 1992-93. *Lancet* 1994, 344: 665-670.
57. AVOORT VAN DER, H.G.A.M., REIMERINK, J.H.J., RAS, A., MULDER, M.N., VAN LOON, A.M. Isolation of epidemic poliovirus from sewage during the 1992-3 type 3 outbreak in the Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 1995, 114 : 481-491.
58. EVANS, D.M.A., DUNN, G., MINOR, P.D., SCHILD, G.C., CANN, A.J., STANWAY, G., ALMOND, J.W., CURREY, K., MAIZEL, J.V. A single nucleotide change in the 5' non-coding region of the genome of the Sabin type 3 poliovaccine is associated with increased neurovirulence. *Nature* (London) 1985, 314: 548-550.
59. TATEM, J.M., WEEKS-LEVY, C., MENTO, S.J., DIMICHELE, S.J., GEORGIU, A., WATERFIELD, W.F., SHEIP, B., COSTALAS, C., DAVIES, T., RITCHEY, M.B., et al. Oral poliovirus vaccine in the United States: molecular characterization of Sabin type 3 after replication in the gut of vaccinees. *J. Med. Virol.* 1991, 35: 101-109.
60. KNOLLE, H. Transmission of poliomyelitis through drinking water and the problem of its eradication. *Gesundh. Wes.* 1955, 57: 351-354.
61. YEAGER, J.G., O'BRIEN, R.T. Enterovirus inactivation in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979, 38: 694-701.
62. BIZIAGOS, E., PASSAGOT, J., CRANCE, J.M., DELOINCE, R. Long-term survival of hepatitis A virus and poliovirus type 1 in mineral water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, 54: 2705-2710.
63. SCHWARTZBROD, Q.L., FINANCE, C., AYMARD, M., BRIGAUD, M. Recovery of Reoviruses from tap water. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. B* 1985, 181: 383-389.
64. O'BRIEN, R.T., NEWMAN, J.S. Inactivation of polioviruses and coxsackieviruses in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1977, 33: 334-340.
65. HURST, C.J., BENTON, W.H., McCLELLAN, K.A. Thermal and water source effects upon the stability of enteroviruses in surface freshwaters. *Can. J. Microbiol.* 1989, 35: 474-480.
66. SATTAR, S.A., RAPHAEL, R.A., SPRINGTHORPE, V.S. Rotavirus survival in conventional treated drinking water. *Can. J. Microbiol.* 1984, 30: 653-656.
67. YATES, M.V. 1992. Biomonitoring of environmental contamination. In: *Encyclopedia of Microbiology*, Vol.1. J. Lederberg (Ed), Academic Press New York, Vol 1, pp 321-330.
68. HOFF, J.C. Principles of drinking water disinfection for pathogen control. In: *Methods for the investigation and prevention of waterborne disease outbreaks*. Gunther F. Craun (Ed), EPA/600/1-90/005a, 1990. p 185-192.
69. HAAS, C.N., ROSE, J.B., GERBA, C., and REGLI, S. Risk assessment of virus in drinking water. *Risk Anal.* 1993, 13: 545-552.
70. MA, J.F., STRAUB, T., PEPPER, I.L., GERBA, C. Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60: 4203-4206.
71. MUSCILLO, M., LA ROSA, G. 1994c. Identificazione di enterovirus in lisati cellulari mediante RT-PCR: differenziazione fra poliovirus e non-poliovirus. *L' Igiene. Moderna.* 103: 223-236.
72. HURST, C. J. Virological analysis of environmental water samples. In: *Methods for the investigation and prevention of waterborne disease outbreaks*. Gunther F. Craun (Ed). EPA/600/1-90/005. 1990, p.275-284.
73. SHIEH, Y.-S.C., WAIT, D., TAI, L., SOBSEY, M.D. methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* , 54 : 51-66.
74. MORONI, M., GALLI, M., ZEHENDER, G. Mezzi di accertamento diagnostico in patologia infettiva. In: *Manuale di malattie infettive*. M. Moroni, R. Esposito, F. de Lalla (Eds). 4ª edizione, Masson, 1995 p 65-82.

75. MUSCILLO, M., LA ROSA, G., AULICINO, F.A., ORSINI, P., BELLUCCI, C., and MICARELLI, R. Comparison of DNA probe hybridizations and RT-PCR detection methods for the identification and differentiation of enteroviruses isolated from sea water samples . *Water Res.* 1995, 29: 1309-1316.
76. HOLLAND, J.. Replication error, quasispecies populations, and extreme evolution rates of RNA viruses. In : *Emerging viruses*. S.S. MORSE (Ed.) Oxford University Press New York 1993 p. 203-218.

CIANOFICEE TOSSICHE E TECNICHE DI RILEVAMENTO DELLE TOSSINE NELLE ACQUE POTABILI

Milena Bruno

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Le fioriture di alghe appartenenti alle Cianoficee nelle acque dolci destinate al consumo umano stanno diventando un problema crescente in tutto il mondo, a seguito dell'aumento dei livelli trofici nei corpi d'acqua.

Le fioriture di certe specie di Cianoficee pongono un potenziale rischio per la salute umana, a causa della produzione di neuro- ed epatotossine idrosolubili: queste tossine sono rilasciate nell'acqua quando le cellule muoiono o vengono lisate da agenti chimici come il solfato di rame, che viene usato per contrastare le fioriture algali. Numerose evidenze sperimentali chiamano in causa le tossine delle Cianoficee in episodi di intossicazione acuta negli uomini, ed oltre a ciò è stato dimostrato recentemente che le epatotossine sono potenti promotori di tumori epatici, anche a concentrazioni bassissime.

In anni recenti fioriture di Cianoficee che si sono verificate in acque dolci italiane sono state investigate in questo laboratorio dal punto di vista delle specie responsabili e del genere di tossine prodotte. Queste sono per lo più costituite da microcistina -RR ed anatoxina -a, e vengono prodotte dalle specie più ricorrenti: *Oscillatoria rubescens*, *Anabaena planctonica*, *Microcystis aeruginosa* ed *Anabaena flos-aquae*.

I corpi d'acqua interessati erano in genere piccoli laghi adibiti ad uso sportivo (ad es. il lago S. Puoto, in provincia di Latina), o bacini artificiali creati tramite sbarramento di fiumi e costituiti per supplire alle necessità di acqua potabile di alcune città del Sud, come il complesso degli invasi del Campidano, vicino Cagliari, o l'invaso del Liscione, nell'area di Campobasso. Questi sbarramenti vennero effettuati senza un preventivo studio dell'impatto che sarebbe andato a determinarsi sul futuro ambiente acquatico. In parte di questi casi l'origine dei problemi è dovuta alla tipologia del suolo scelto come cuvetta, formato in massima parte da terreno e non da roccia, e quindi ideale per lo sviluppo di un ambiente eutrofico.

L'uso di alghicidi chimici elimina le Cianoficee, lisandole, ma libera le tossine nelle acque; attualmente i sistemi di depurazione più efficaci e costosi, che utilizzano i filtri a carboni attivi, fermano il 95% circa delle tossine, lasciandone passare una percentuale ridottissima ma pur sempre attiva.

Il metodo più sicuro ed economico per il controllo dell'accumulo di tossine e del rischio di ingresso in rete, perciò, consiste primariamente in una politica di gestione delle risorse idriche che porti all'abbattimento del livello di nutrienti nei corpi d'acqua

soggetti a fioriture ed utilizzati per il consumo umano, tramite il controllo degli scarichi e la messa in opera di impianti di depurazione moderni. A questo va affiancato un monitoraggio serio, effettuato in continuo da organi di sorveglianza del territorio, che assicuri il mantenimento di bassi valori di biomassa algale e di nutrienti non solo nel corpo d'acqua interessato, ma in tutto il bacino idrografico da cui esso dipende.

Aspetti ecologici

Le Cianofitiche sono alghe procariotiche, unicellulari o coloniali, dotate di caratteristiche peculiari che le rendono simili ai batteri, come la mancanza di un nucleo distinto, le ridotte dimensioni cellulari, e l'alta velocità di replicazione in idonee condizioni ambientali. Le Cianofitiche nel loro complesso sono organismi autotrofi, possono cioè fabbricare i carboidrati tramite la fotosintesi, ma presentano anche capacità di eterotrofia facoltativa, vale a dire la capacità, in assenza di luce, di adsorbire ed utilizzare zuccheri come glucosio, saccarosio e fruttosio dall'ambiente esterno, come i batteri e gli organismi animali. In condizioni di luce ridotta, diverse specie sono in grado di attivare ambedue le vie metaboliche. Diverse specie, inoltre, richiedono vitamina B12 per crescere, ed in condizioni ottimali di nutrizione alcune specie unicellulari raggiungono un tempo di amplificazione di 3-8 ore. Delle tre famiglie in cui sono divise le Cianofitiche quella delle *Chroococcales*, con i generi *Coelosphaerium* e *Microcystis*, e quella delle *Oscillatoriales*, con i generi *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Nostoc*, *Anabaena* e *Gloeotrichia*, raggruppano la maggior varietà di generi tossici. Le specie tossiche delle nostre latitudini sono tutte planctoniche, e sono rappresentate quasi esclusivamente da specie d'acqua dolce come *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae*, *Oscillatoria aghardii* ed *Aphanizomenon flos-aquae*.

Le condizioni ambientali che consentono fioriture comprendono alti livelli di nutrienti primari (eutrofia) e fattori fisici favorevoli, come buon irraggiamento, temperatura discretamente alta, ridotto mescolamento. La non contemporanea presenza di questi fattori determina il prevalere di un genere sull'altro: ad esempio, in presenza di risorse ottimali e con un minimo mescolamento si ha un prevalere delle fioriture a *Microcystis* rispetto a quelle ad *Oscillatoria*.

Il genere *Microcystis* è tipico di laghi eutrofici relativamente ricchi in fosforo totale e soleggiati durante l'estate, ma contrariamente alle apparenze non è dotato di un tasso di crescita particolarmente veloce: ad esempio esso è inferiore comunque a quello delle Volvocali, Clorofitiche tipiche di acque oligotrofiche ed ossigenate.

Con risorse nutrienti non ottimali e con una limitazione dell'irraggiamento causata da un mescolamento accentuato, avviene il contrario, cioè una maggior percentuale di fioriture di *Oscillatoria*. Quest'ultimo genere domina acque eutrofiche soleggiate, soggette a mescolamento, e l'epilimnio estivo dei laghi più grandi e mesotrofici [1, 2].

L'instaurazione di una fioritura di Cianofitiche richiede:

- ambienti neutri o lievemente alcalini, in genere fino a pH 8 (un'eccezione è rappresentata dal genere *Chroococcus*, che prospera nelle marcite a pH 4);

- temperature in genere elevate (nel parco di Yellowstone alghe azzurre vivono addirittura intorno allo sbocco dei geysers dove la temperatura si approssima a 70 °C);
- acque ricche di nutrienti; un'eventuale deficienza di azoto favorirebbe l'emersione di specie azotofissatrici mediante eterocisti o in anaerobiosi, che in quest'ultimo caso possono essere rilevate con il saggio della riduzione dell'acetilene (C₂H₂).

Riassumendo, in presenza di nutrienti, luce e temperatura adeguate la produttività primaria aumenta, causando una eventuale scomparsa progressiva dei nitrati, una diminuzione della anidride carbonica disciolta ed un utilizzo della CO₂ del bicarbonato, con conseguente innalzamento del pH ed una finale insorgenza dei popolamenti a Cianoficee.

Il pH è un fattore importante, in quanto a pH superiori a 9, troppo elevati, si ha una precipitazione dello ione ferro in soluzione, che quindi non è più assimilabile dalle Cianoficee; a pH troppo bassi, viceversa, è il molibdeno, necessario per la nitrogenasi e la nitrato-reduttasi, a non essere più assimilabile, ed inoltre l'ambiente acido danneggia direttamente la clorofilla delle Cianoficee.

I fattori che permettono alle Cianoficee di competere con successo con le alghe verdi sono la capacità di sintrofia con i batteri eterotrofi, la possibilità di fissazione dell'azoto atmosferico e la maggiore efficienza di utilizzo della CO₂ in ambienti alcalini (infatti l'immissione di anidride carbonica, azoto e fosforo in laghi con dominanza di Cianoficee fa insorgere popolamenti di Cloroficee). L'elevata attività di fotosintesi causa in esse il collasso dei vacuoli cellulari e l'affondamento dei popolamenti, che sono in grado di utilizzare i nutrienti contenuti in grandi volumi d'acqua, rimanendo in quiescenza durante l'inverno e riproponendo le fioriture dopo il rimescolamento primaverile.

Per questo, i sistemi per favorire i popolamenti a Cloroficee, ecologicamente più desiderabili, comprendono: la rimozione manuale, mediante retinaggio dell'accumulo superficiale di alghe, che a volte può essere molto spesso; le immissioni di anidride carbonica, con o senza aria; l'abbattimento dei livelli di fosforo mediante il controllo dell'inquinamento da fonti diffuse o controllabili; ed infine il rimescolamento idrico ove possibile ed opportuno [3].

Il rimescolamento artificiale implica una rimessa in circolo di anidride carbonica con nutrienti dagli strati profondi, ma anche l'ingresso di ossigeno ed anidride carbonica dall'atmosfera, con conseguente abbassamento del pH.

Questo si traduce, in un lago termicamente stratificato, nel declino delle popolazioni a Cianoficee e nell'emersione di popolamenti ad alghe verdi, più pesanti delle precedenti, che nelle nuove condizioni ambientali diventano dominanti.

Aspetti sanitari e meccanismi di azione

Le specie del genere *Microcystis* furono le prime ad essere studiate per la produzione di tossine, e tra esse la più indagata e maggiormente responsabile di fioriture tossiche è

senz'altro *Microcystis aeruginosa*, un'alga unicellulare ubiquitaria, con preferenza per le acque lentiche, che si presenta al microscopio in agglomerati di cellule.

Le sue caratteristiche ecologiche sono: una richiesta di azoto molto alta (l'optimum *in vitro* è di 13,6 mg/L) e nello stesso tempo l'incapacità a fissare l'azoto atmosferico; una bassa richiesta di fosforo (in vitro l'optimum è ad 1,8 mg/L, con un rapporto N/P medio di 75/1) ed una richiesta media di zolfo (almeno 0,83 mg/L); un pH alcalino, tra 8 e 10.

La specie comprende due varietà responsabili di fioriture, l'aeruginosa e la flos-aquae, di cui solo la prima, però, è produttrice di tossine. Le tossine vengono rilasciate tramite rottura delle cellule, dovuta a morte naturale o a danneggiamenti chimici (ad es. da algicidi come CuSO_4 , sostituibile con l'idrossido di calcio, che non rompe le cellule), o digestione nello stomaco.

Le fioriture tossiche a carico di *Microcystis aeruginosa* sono segnalate da decenni in tutto il mondo, con frequenze anche alte in stati come il Minnesota, il Giappone, il Sudafrica. A parità di peso le tossine prodotte sono 20 volte più potenti dell'acido cianidrico e della stricnina, nel biosaggio su topo causano la morte dei topi di 18-24 g di peso entro 30 minuti - 3 ore dopo inoculo intraperitoneo di 0,1 - 0,5 ml di tossina purificata in sol. fisiologica [4].

Le tossine prodotte sono eptapeptidi monociclici a basso peso molecolare (circa 1.000 dalton), costituiti da un carboidrato di bloccaggio, sette residui aminoacidici ed una metilammina. Gli eptapeptidi si diversificano tra loro mediante due L-aminoacidi variabili, e finora sono state isolate in tutto il mondo ben 40 varianti diverse della tossina.

Un caratteristico marker delle microcistine è l'aminoacido ADDA, peculiare delle specie *Microcystis aeruginosa*, *Nodularia spumigena* e *Oscillatoria aghardii*, ed abbreviazione dell'acido 3-amino-9 metossi-10 fenil-2,3,8-trimetildeca-4,6 dienoico, caratterizzato, come la struttura generale, mediante spettroscopia NMR e spettrometria di massa.

Il probabile ciclo cellulare della tossina, come appare dallo stipite più studiato, l'NRC-1, con LD_{50} compresa tra 40 e 480 mg/kg di peso, mostra il massimo di produzione nella fase logaritmica cellulare, dove l'optimum di produzione si ha a 2 °C in meno della temperatura ottimale per la coltura algale. La cessazione di produzione si ha nella fase stazionaria; alla morte della cellula si ha la liberazione della tossina nell'ambiente, con un tempo di degrado di tre settimane circa, tale da sconsigliare l'uso immediato delle acque a scopo potabile.

La localizzazione intracellulare delle tossine è nella regione del nucleoide ed attorno ai tilacoidi. Essa ha probabilmente una funzione metabolica attiva all'interno della cellula, permanente o intermittente, forse legata alla sua attività inibitrice delle proteinfosfatasi.

La struttura ciclica della tossina la rende molto resistente agli enzimi litici, come pepsina, papaina, tripsina, ecc. L'idrolisi acida dopo 70 ore ne riduce la tossicità del 100%, ma l'autoclave in ambiente neutro non la distrugge.

I normali processi di potabilizzazione non la fermano [5, 6]. Studi recenti hanno appurato che alcuni ceppi tossici producono isomeri strutturali o epimeri della tossina, differenti nella configurazione assoluta o nella sequenza di aminoacidi o nei legami vicini agli aminoacidi acidici: queste varianti sono completamente innocue. Le tossine purificate

inibiscono lo sviluppo della microflora saprofitica nelle fosse artificiali usate come lagunaggio. Le microcistine sono forti inibitori delle proteinfosfatasi 1, 2a e 3. Poiché si pensa che le proteinfosfatasi possono invertire l'azione della protein chinasi C, la loro inibizione si traduce nell'attivazione di una serie di processi metabolici che hanno risvolti acuti, riguardanti la disgregazione delle membrane citoplasmatiche, e cronici, riguardanti l'attivazione di oncogeni che innescano tumori gastrointestinali ed epiteliali. I danni istologici acuti riguardano il fegato, organo bersaglio principale, i polmoni ed i reni. Le lesioni si esplicano con necrosi degli epatociti, emorragie estese con distribuzione perilobulare, scollamento delle cellule e perdita dell'architettura tissutale, rottura delle cellule dell'endotelio sinusoidale, e scomparsa degli spazi di Disse tra epatociti e sinusoidi. Gli enzimi citoplasmatici tissutali aspartato-amino-transferasi e lattatodeidrogenasi crescono da 50 a 20 volte nel siero degli animali trattati. La sintomatologia umana prevede, dopo 3-4 ore dall'ingestione, gastralgia, vomito, diarrea e dolori intestinali. Più tardi subentrano febbre, emicrania acuta, dolori muscolari ed articolari, debolezza, aumento delle ggt, indice di un danno epatico, nessuno o debole incremento di alanino-amino transferasi e fosfatasi alcalina. La fase epatica dura circa due giorni, a cui seguono uno-due giorni di fase letargica con severi squilibri elettrolitici, ed una fase diarroica di cinque giorni [3]. Con il miglioramento delle comunicazioni scientifiche cominciano ad essere acquisiti casi di morti umane dovute ad ingestione di microcistine. Uno di questi sembra essere quello riferito da Texeira et al. (1993), relativo a 2.000 casi di gastroenterite, di cui 88 fatali in un periodo di 42 giorni, dovuti all'inondazione, con conseguenti fioriture tossiche e contaminazione delle acque potabili, causata dalla diga di Itaparica nello stato di Bahia (Brasile) [7].

Le microcistine hanno peraltro una azione dannosa anche sull'ambiente: la loro tossicità si esplica sullo zooplancton, con una selezione delle specie resistenti ed una diminuzione globale delle popolazioni, con conseguente diminuzione della biomassa zooplanctonica disponibile per la catena alimentare; un accumulo nei molluschi d'acqua dolce come *Anodonta cignea*; e danni diretti alla pompa sodio/potassio e cloruro/carbonato delle cellule del cloro nelle branchie dei pesci, con conseguente morte per asfissia.

Notevoli sono anche i danni che possono essere provocati ad anatidi, bestiame vario e cani che si abbeverino a stagni o laghi contaminati da una fioritura tossica, o che consumino la vegetazione rivierasca ricoperta dalla fioritura.

Due particolari microcistine, le varianti -RR ed -YR, sono prodotte anche da diverse specie del genere *Oscillatoria*. Differenze esistono nella efficienza di produzione, da cinque a dieci volte inferiore rispetto alle specie di *Microcystis*.

Le specie di *Oscillatoria* richiedono condizioni ecologiche di fioritura comprendenti bassa trasparenza, bassa intensità luminosa, fosforo totale a partire da 30-40 mg/L, azoto totale tra 600 e 900 mg/L, pH tra 8,5 e 10.

La specie *Oscillatoria formosa* produce anche l'omoanatosina-a, variante metilenica dell'ammina secondaria anatosina-a, di cui diremo in seguito, e come questa potente agente bloccante neuromuscolare. Il genere *Nodularia*, anch'esso appartenente alle Cianofitiche e tipico di acque salmastre, produce tossine peptidiche cicliche chiamate

nodularine, strutturalmente identiche alle microcistine, a parte il numero di residui aminoacidici, cinque anziché sette. Le nodularine hanno attività biologica identica alle microcistine, e stesse caratteristiche di resistenza ai normali processi di potabilizzazione.

Il genere *Anabaena*, con le specie *A. flos-aquae*, *A. circinalis*, *A. planctonica*, è produttore delle anatoossine, una famiglia di ammine secondarie bicicliche (2-acetil-9-azabicyclo(4.2.1.)non-2-ene) con bersaglio neuronale. L'anatoossina-a, in percentuale la più frequente, è un potente agente bloccante neuromuscolare postsinaptico che agisce come depolarizzante; la variante anatoossina-a(s) è un'anticolinesterasi reversibile.

Il genere *Aphanizomenon*, con la specie *A. flos-aquae*, produce le saxitossine, composti guanidinici eterociclici anch'essi a bersaglio neuronale, potenti bloccanti della conduzione dei canali del sodio, molto conosciuti per essere i temuti prodotti del genere marino *Alexandrium*, appartenente al taxon delle Pirrofitte.

Misure per il controllo del rischio

Riassumendo, i possibili danni derivanti dal consumo umano di tossine sono raggruppabili come segue:

	Danni acuti	Danni cronici
microcistine nodularine	epatotossicità gastroenterite acuta	attività promuovente tumori epatici ed epiteliali
saxitossine	gastroenterite acuta paralisi exitus	
anatoossine	gastroenterite acuta paralisi exitus	

Da quanto sopra risulta evidente l'importanza di adottare sistemi di potabilizzazione adeguati, perlomeno per i corpi d'acqua eutrofizzati e soggetti a fioriture cicliche.

Per le microcistine e le nodularine si ottengono buoni risultati con la clorazione delle acque, che deve essere tale da lasciare un residuo clorico di almeno 0,5 mg/L dopo 30 minuti di contatto ad un pH inferiore ad 8.

L'ozonizzazione rappresenta il trattamento più veloce, perché a dosi di 0,1 mg/L di ozono consente di eliminare le tossine in pochi secondi [1][6].

L'adsorbimento su carboni attivati è senz'altro il metodo più "pulito", scevro da residui tossici nell'acqua, ma devono essere rispettate alcune condizioni fondamentali: in

caso di utilizzo di PAC (Powdered Activated Carbons), meno costosi, deve essere scelto il tipo derivato dal legno, con pori di diametro da 2 a 50 nm.

I GAC (Granular Activated Carbons) hanno un'attività elevatissima, ma sono abbastanza costosi.

Il trattamento delle anatoossine e delle saxitossine li richiede espressamente [8].

Aspetti metodologici

Il livello di allarme preventivo delle fioriture in un corpo d'acqua adibito ad usi potabili inizia da 500 a 2.000 cell/L nel monitoraggio di routine, numeri di cellule che indicano una fioritura in evoluzione, con presenza o meno di odori e sapori sgradevoli.

A partire da 2.000-15.000 cell/L si può definire la fioritura in atto.

Poiché non c'è alcun rapporto tra presenza di odori sgradevoli e presenza di tossine nelle acque, questi non possono essere utilizzati per allertare i controlli.

I metodi di rilevazione delle tossine si basano sull'analisi degli estratti cellulari mediante:

- biosaggi, che possono essere sia batterici che su animali;
- analisi strumentali, che comprendono l'impiego di HPLC, GC-MS o HPTLC;
- metodi enzimatici, come il biosaggio delle protein-fosfatasi, o ELISA con impiego di anticorpi monoclonali [8].

Questi due ultimi sistemi non verranno esaminati in questa trattazione, poiché ancora a livello sperimentale, in uso presso laboratori di ricerca.

Nel nostro laboratorio viene impiegato il biosaggio batterico MICROTOX, in eventuale accoppiata con l'analisi su HPLC.

L'estrazione delle tossine dalle alghe varia a seconda del tipo di tossina.

Si consiglia di eseguirla, per quanto possibile, su centrifugati di cellule fresche, per minimizzare la perdita naturale di carica tossica, che avviene già nel liofilizzato.

Gli estratti devono comunque essere stoccati in piccole quote a -30°C o (meglio) a -70°C, poiché ripetuti congelamenti e scongelamenti per prelevare aliquote di studio, causerebbero perdite anche notevoli delle tossine.

Le tecniche di estrazione sono illustrate di seguito:

ESTRAZIONE DELLE MICROCISTINE E DELL'ANATOSSINA-A DALLE ALGHE

Metodi:

MICRO

Sospendere con vortex

- 1) 10 mg di alghe in peso fresco in:
1 ml di H₂O bidistillata
- 2) Sonificare per 5 min. a 30-40 °C (dopo
2,5 min. vortex per 20 sec.
- 3) Centrifugare per 10 min. ad 11.000
r.p.m. (10.000 g)
- 4) Raccogliere il supernatante, sospendere
nuovamente il pellet e ripetere il tutto da
3) a 5). Unire i due supernatanti e
procedere al test

MACRO

Sospendere con vortex

- 200 mg di alghe in peso fresco in:
10 ml di H₂O bidistillata
- 2) Sonificare per 5 min. a 30-40 °C (dopo
2,5 min. vortex per 20 sec.
- 3) Centrifugare per 20 min. ad 8.000
r.p.m. (10.000 g)
- 4) Raccogliere il supernatante, sospendere
nuovamente il pellet e ripetere il tutto da
3) a 5). Unire i due supernatanti e
procedere al test

ESTRAZIONE DELLE SAXITOSSINE DALLE ALGHE

Metodi:

MICRO

Sospendere con vortex

- 1) 10 mg di alghe in peso fresco in:
1 ml di H₂O sterile bidistillata
- 2) Riscaldare per 5 min. a 70 °C
- 3) Sonicare per 5 min. a 30-40 °C (dopo
2,5 min. vortex per 20 sec.
- 4) Centrifugare per 10 min. ad 11.000
r.p.m. (10.000 g)
- 5) Raccogliere il supernatante, sospendere
nuovamente il pellet e ripetere da 3) a 5).
Unire i due supernatanti e procedere al
test.

MACRO

Sospendere con vortex

- 200 mg di alghe in peso fresco in:
10 ml di H₂O sterile bidistillata
- 2) Riscaldare per 5 min. a 70 °C
- 2) Sonicare per 5 min. a 30-40 °C (dopo
2,5 min. vortex per 20 sec.
- 4) Centrifugare per 20 min. ad 8.000
r.p.m. (10.000 g)
- 4) Raccogliere il supernatante, sospendere
nuovamente il pellet e ripetere il tutto da
3) a 5). Unire i due supernatanti e
procedere al test.

Gli estratti vengono quindi sottoposti al MICROTOX. Il principio di questo biosaggio e' la sensibilità alle sostanze tossiche mostrata dal batterio marino di profondità *Photobacterium phosphoreum*, che a contatto con quattro diluizioni scalari della sostanza sospetta, in caso di tossicità perde parte della bioluminescenza che lo caratterizza. Questa perdita, proporzionale alla quantità di tossina con cui il batterio viene a contatto, può essere misurata con un luminometro che la converte in un valore di scala. I quattro valori scalari così ottenuti, più un bianco di riferimento, vengono elaborati in una curva di regressione, di cui vengono calcolati i limiti di confidenza.

Il tempo di contatto del batterio con la sostanza tossica può essere di cinque o quindici minuti, e i valori misurati in questi due tempi diversi permettono di ottenere curve riferibili rispettivamente all'effetto "acuto" e all'effetto "cronico" della tossina.

Dalla curva di regressione si può estrapolare il valore di EC₅₀ a 5 o 15 minuti, pari alla quantità di tossina necessaria per diminuire la luminosità batterica del 50%. La sensibilità dello strumento alle varie tossine e' notevole (1 mg/ml di saxitossine, 0,5 mg/ml di microcistine, 10 mg/ml di anatoxina-a), ma la natura dell'organismo usato non permette di arguire il tipo di tossina presente, per cui può rendersi necessaria una ulteriore identificazione mediante HPLC.

I metodi che seguono sono relativi all'indagine strumentale delle tossine qui esaminate.

MICROCISTINE E NODULARINE

limite: 1 mg/L

HPLC in fase inversa con photo-diode array detection a 240 nm.

Fase mobile: 27-30% acetonitrile/0,1 M tampone fosfato (pH 7) ad un flusso di 1 ml/min.

Colonna: Brownlee ODS 5mm sferi-analitica 220 x 4,7 mm.

Altro metodo:

Fase mobile: 12% acetonitrile/0,1 M tampone potassio diidrogeno fosfato (pH 6,8), flusso 1 ml/min., wv 238 nm, 0,005 AUFS, volume del campione 50 ml..

Colonna: Regis ISRP GFF S5-80, oppure C18 RP Lichrochart; entro cinque minuti si ha la risoluzione delle tossine -RR; -YR; -LR.

ANATOSSINA-A primo metodo

Estrazione per sonicazione in ghiaccio di 5mg di liofilizzato in soluzione fisiologica. Iniezione di 2 ml (splitless per 0,6 min.) in GC Varian modello 3500 con autocampionatore mod.8100.

Iniezione divisa nelle due colonne capillari di silicio DB-5 e DB-1701 di 30 m ciascuna, 0,25 mm ID, 0,25 mm spessore di film (J e W Scientific) fuse da un connettore Glasseal

Y (Supelco) e monitorate su detector a cattura di elettroni separati. TOC di iniezione: 250 °C; t°C del detector: 300°C.

Flusso di H₂ a 1,5 ml/min. misurato ai detector. Flusso di N₂ a 25 ml/min.

Temperatura delle rampe:

T°C iniziale colonna: 100°C

Tempo di attesa iniziale: 0 min.

1° step T°C colonna: 200 °C

1° step tasso di rampa: 20°C/min.

1° step tempo di attesa: 0 min.

2° step T°C colonna: 226 °C

2° step tasso di rampa: 2,0 °C

2° step tempo di attesa: 0 min.

3° step T°C colonna: 265 °C

3° step tasso di rampa: 20 °C/min.

3° step tempo di attesa: 3 min.

ANATOSSINA-A secondo metodo

Gli estratti vanno dissolti in 1-2 ml 1 mM HCl, diluiti con 20 ml H₂O e alcalinizzati con NaOH 1N fino a pH 11.

Far seguire quattro estrazioni successive con 50 ml CH₂Cl₂ ciascuna.

La fase organica viene filtrata su colonna da 25 cm x 1,5 cm impaccata con 15 g di Na₂SO₄ anidro, e raccolta in flask da 300 ml. Il lavaggio finale della colonna viene eseguito con approssimativamente 25 ml di CH₂Cl₂.

La fase organica viene ridotta a 2-3 ml con rotovapor (T°C 40°C) ed evaporata a secco sotto blanda corrente di azoto.

L'estratto viene dissolto in 2 ml acetone; 60 ml KOH 30% e 100 ml 1% PFB (pentafluorobenzilbromuro Fluka) in acetone vengono aggiunti, e la soluzione viene riscaldata per 3 ore ad 80°C.

Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, il solvente viene attentamente evaporato e l'estratto dissolto in 1-10 ml di isoottano, pronto per l'analisi in GC-massa.

SAXITOSSINE

(Vengono rilevate la saxitossina, la neosaxitossina, tutte le goniautossine da 1 a 6 e le C-tossine da 1 a 4)

HPLC primo metodo

Due fasi mobili:

A) Acido sulfonico di esano 1,5 mM, più acido sulfonico di eptano 1,5 mM in tampone ammonio fosfato 1,5 mM a pH 6,70

B) 25% di acetonitrile, più acidi sulfonici di esano ed eptano come sopra in tampone ammonio fosfato 6,25 mM a pH 7.

Si crea un gradiente da **A)** a **B)** attraverso una colonna PRP-1 di 15 cm x 4,1 mm (Hamilton): in 19 minuti di flusso vengono risolte tutte le tossine.

HPLC secondo metodo

Tre fasi mobili:

A) Tetrabuttilammonio fosfato 1 mM portato a pH 5 con acido acetico;

B) sodio 1-eptansulfonato 2 mM in ammonio fosfato 10 mM a pH 7,2;

C) tampone eptansulfonato come sopra/acetonitrile 9:1.

Le tre fasi vengono fatte correre isocraticamente attraverso una colonna C 8 (Develosil C 8-5, 250 mm x 4,6 mm, Nomura Chemical).

Le tossine vengono risolte in quest'ordine:

- C-tossine 1-4
- GTX 1-6, dcGTX 2 e 3
- STX, neo-STX, dcSTX

Entrambi i metodi usano una procedura sviluppata da Bates e Rapoport nel 1975 e modificata, che comprende una ossidazione basica con periodato per produrre derivati fluorescenti delle tossine, rilevabili per emissioni a 390-400 nm dopo eccitazione a 330-340 nm.

Eventualmente, a questi metodi può essere associata la identificazione mediante FAB-spettrometria di massa, per una ulteriore sicurezza corroborativa di individuazione corretta di saxitossine.

BIBLIOGRAFIA

1. FAWELL, J.K. HART, J. JAMES, H.A. PARR, W. Blue-green algae and their toxins-analysis, toxicity, treatment and environmental control. *Water Supply*, 1993, 11(3-4): 109-121.
2. BOLD, H.C., WYNNE, M.G. Introduction to the algae (2^a Ed.). *Prentice Hall Ed.*, 1985.

3. BRUNO, M., VOLTERRA, L. Caratteristiche ed attività dell'alga Cianoficea *Microcystis aeruginosa*. *Acqua, Aria, Settemembre* 1989: 889 - 900.
4. CARMICHAEL, W.W., JONES, C.L., THEISS, W.C. Algal toxins and water based diseases. *Critical Reviews in Env. Control*, 1985, 15(3): 275-314.
5. FALCONER, Ian R. Algal toxins in seafood and drinking water. *Academic London Publisher (UK)* 1993, 224 p.
6. KENEFICK, S.L., HRUDEY, S.E., PETERSON, H.G., PREPAS, E.E. Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. *Water Science and Technology*, 1993, 27(3-4): 433-440.
7. TEIXEIRA DA GLORIA LIMA CRUZ, M., DA CONCEICAO NASCIMENTO COSTA, M., LUCIA PIRES DE CARVALHO, V., DOS SANTOS PEREIRA, M., HAGE, E. *Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica dam. Bahia, Brazil 1993. Bulletin of the Pan American Health Organization* 27(3): 244-253.
8. LAMBERT, T.W., BOLAND, M.P., HOLMES, C.F.B., HRUDEY, S.E. Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphatase bioassay. *Environmental Science and Technology ESTHAG.*, 1994 28(4): 753-755.
9. FALCONER, I.R., RUNNEGAR, M.T., BUCKLEY, T., HUYN, V.L., BRADSHAW, P. Using Activated Carbon to remove toxicity from drinking water containing cyanobacterial blooms. *Journal of the American Water Work Association*, 1989, 81(2): 102-105.

ALGHE NELLE ACQUE POTABILI

Paola Margherita Bianca Gucci

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Aspetti igienico - sanitari

La crescente richiesta di acque destinate a scopo potabile ed il quasi totale sfruttamento delle riserve idriche sotterranee, potenzialmente protette, ha portato sempre più frequentemente all'utilizzazione di acque superficiali di fiumi e di laghi, le cui acque possono avere elevati livelli trofici.

L'arricchimento di nutrienti, soprattutto azoto e fosforo, di tali bacini è dovuto il più delle volte all'immissione di acque reflue da insediamenti civili e produttivi, ma in certi casi anche al semplice dilavamento di terreni agricoli o di aree disboscate.

Nelle acque superficiali il numero delle alghe presenti può oscillare da poche unità a molti milioni di organismi per litro.

La loro abbondanza e composizione delle specie sono regolate dalla combinazione delle condizioni naturali ambientali [1]. Le alghe maggiormente rappresentate sono le Diatomee, seguite dalle Clorofite e dalle Cianofite. Durante la stagione invernale prevalgono le Diatomee pennate, mentre in estate sono più abbondanti le Diatomee centriche, le alghe verdi coccoidi e le Cianofite.

Quando le condizioni ambientali lo permettono, le alghe presenti nelle riserve di acque superficiali allo stato endemico, si possono riprodurre in modo abnorme e dare luogo a fioriture di vasta entità.

Produzione di biotossine

La presenza delle alghe nelle acque di superficie ha portato pertanto a tutta una serie di problemi, primo fra tutti quello legato alle biotossine che possono essere prodotte dalle alghe; infatti alghe produttrici di biotossine si ritrovano nei 5 phyla : Cianofite, Clorofite, Crisofite (a cui appartengono fra l'altro le Diatomee), Pirofite e Rodofite.

Nelle riserve idriche di acqua dolce le Cianofite sono le più importanti in quanto possono avere un riflesso sulla salute pubblica [2, 3].

Nell'ambito delle Cianofite molti generi comprendono specie le cui varietà sono in grado di produrre sostanze tossiche. I generi *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* ed *Oscillatoria* è stato accertato che producono biotossine, mentre altri generi comprendenti ad esempio *Coelosphaerium*, *Gloeotrichia*, *Microcoleus*, *Schizothrix*, *Spirulina* è stato trovato essere tossici, ma ancora nessuna tossina è stata isolata e caratterizzata [4].

In Italia solo a partire dal 1985 sono stati registrati casi di fioriture di Cianofitiche aventi effetti tossici nei saggi di laboratorio eseguiti. Le alghe responsabili erano *Microcystis aeruginosa* ed *Oscillatoria rubescens*; tali fioriture hanno interessato degli invasi le cui acque erano destinate anche a scopo potabile.

Microcystis aeruginosa è un'alga unicellulare dalla forma globosa; spesso gli individui sono riuniti a migliaia in una guaina gelatinosa non ben delimitata.

Nell'ambito della specie *Microcystis aeruginosa* esistono due varietà: *aeruginosa* e *flos-aquae*. Entrambe sono responsabili di fioriture algali, ma soltanto la varietà *aeruginosa* è in grado di produrre tossine.

L'alga per potersi sviluppare oltre misura ha necessità di una elevata concentrazione di azoto piuttosto che di altri elementi. Poiché *Microcystis* non è in grado di fissare l'azoto atmosferico, l'apporto di questo elemento, in condizioni naturali, rappresenta il fattore limitante [5].

Negli anni '50 è stato possibile isolare e coltivare *Microcystis aeruginosa* in laboratorio e questo ha così permesso la caratterizzazione della tossina prodotta.

Dai primi studi eseguiti [6] essa sembrò potesse essere un alcaloide, in seguito invece sono stati isolati due differenti principi tossici [7]: uno, denominato "fattore di morte lenta" (SDF, Slow Death Factor), che provocava la morte nei topi in 1-2 giorni e l'altro che causava la morte entro le tre ore dalla somministrazione e perciò detto "fattore di morte rapida" (FDF, Fast Death Factor).

Successivamente studi più approfonditi hanno dimostrato che l'SDF non veniva prodotto dall'alga, ma la sua origine era da attribuire ai batteri di accompagnamento dell'alga stessa [8], mentre hanno stabilito che l'FDF era una endotossina di natura proteica, epatotossica [9].

Per il ceppo denominato NRC-1, il primo stirpe di *Microcystis aeruginosa* isolato e coltivato in laboratorio, la DL 100 (Dose Letale 100), per iniezione intraperitoneo nei topi, è risultata variabile tra 40 e 480 mg / kg di peso corporeo [9].

Negli anni '70 il perfezionarsi delle tecniche di estrazione e di indagine ha portato alla scoperta dell'esistenza di più tossine di natura polipeptidica ascrivibili al gruppo FDF [10, 11]. Esse sono risultate essere fra loro simili sia per quanto riguarda la struttura che la composizione aminoacidica. È stato anche dimostrato che potevano essere prodotte da ceppi differenti di *Microcystis*, ma anche uno stesso ceppo era in grado di produrre più di una tossina [12].

A partire poi dal 1983, utilizzando la tecnica dell'HPLC [13, 14], si è potuti arrivare alla caratterizzazione della struttura chimica delle tossine: esse sono risultate essere degli eptapeptidi monociclici, a basso peso molecolare, contenenti sia D- che L-aminoacidi.

Le tossine, oggi conosciute con il nome di microcistine, si differenziano fra loro soltanto per due L-aminoacidi variabili [15, 16] e pertanto, per distinguerle una dall'altra, vengono caratterizzate dalle sigle dei due aminoacidi che le diversificano [17]: così, ad esempio, la microcistina -LR contiene gli aminoacidi leucina ed arginina, la microcistina -LA gli aminoacidi leucina ed alanina. Fino ad ora sono note circa 24 varianti più altri epimeri non tossici delle microcistine -LR e -RR [18].

Le microcistine -LR sono quelle che vengono ritrovate con maggiore frequenza.

La tossicità di queste microcistine non varia molto, infatti tutte le varie tossine hanno una DL 50 compresa fra 60 e 70 ug / kg, quando vengono iniettate intraperitoneo nei topi, con danni simili per tutte le microcistine.

L'organo bersaglio della tossina è il fegato. Nel saggio di tossicità acuta, nei topini, si è visto infatti che la morte viene provocata da emorragia lobulare epatica con necrosi degli epatociti [19].

Alla famiglia delle Oscillatoriacee appartengono sia specie marine che di acqua dolce, alcune delle quali produttrici di biotossine e molto spesso responsabili di intensi bloom algali.

Le Oscillatoriacee dulcacquicole sono alghe filamentose, ubiquitarie, associate a laghi eutrofici; le specie che ricorrono maggiormente durante le fioriture sono : *Oscillatoria aghardii* nelle sue differenti varietà ed *Oscillatoria rubescens*.

La tossicità di *Oscillatoria aghardii* è stata messa in evidenza, per la prima volta, nel 1981 dal norvegese Ostensvik [20] e durante gli anni successivi confermata dagli studi di altri ricercatori finlandesi [21]. Soltanto però verso la fine degli anni '80, con l'utilizzo della tecnica dell'HPLC si è potuti arrivare a caratterizzare la tossina dal punto di vista chimico.

La tossina è risultata avere una struttura molecolare simile a quella delle microcistine, cioè un eptapeptide ciclico; in particolare il tipo di struttura chimica corrisponde alla variante -RR [22].

La tossina prodotta da *Oscillatoria* è però molto meno tossica rispetto a quella prodotta da *Microcystis aeruginosa*, infatti si è visto che la DL50 della tossina estratta da *Oscillatoria* è pari a 320 ug / kg , mentre la DL50 della analoga microcistina estratta da *Microcystis* è di 43 ug / kg [23].

Anche nel caso di *Oscillatoria* le cellule epatiche rappresentano il bersaglio della tossina. In seguito all'esposizione alla tossina per 30 minuti di epatociti freschi di ratto si possono notare infatti importanti cambiamenti a livello morfologico delle cellule, costituiti da scomparsa dei microvilli, rigonfiamento della membrana cellulare e comparsa di una banda di filamenti condensati all'interno della cellula stessa [22]. Questo effetto molto specifico è simile a quello prodotto anche dalle tossine di *Microcystis* ed è probabilmente dovuto ad una interazione con il citoscheletro.

L'impatto sulla salute pubblica dovuto all'utilizzo a scopo potabile di un'acqua contenente un elevato numero di alghe è difficile da valutare dato che il più delle volte si tratta di effetti cronici che scompaiono alla sospensione dell'assunzione dell'acqua stessa, oppure di quadri clinici apparenti con la sintomatologia di una generica gastroenterite [24].

Queste gastroenteriti sono caratterizzate da una eziologia sconosciuta, da un periodo di incubazione molto breve (soltanto 2 - 12 ore dall'ingestione dell'acqua), da dolori addominali e da diarrea, ai quali seguono qualche ora dopo anche febbre e forte emicrania [25].

Anche se la patologia più manifesta nell'uomo è quella di una gastroenterite, analisi cliniche effettuate durante lo stato morboso hanno evidenziato un incremento anomalo di alcuni enzimi correlabili con una alterata funzionalità epatica [25].

Alterazione dei caratteri organolettici

Tra i requisiti di acqua potabile vi è che essa dovrebbe essere priva di colore, sapore ed odore.

Per quanto riguarda il colore si può dire che le alghe alcune volte possono imprimere una colorazione all'acqua. Questo inconveniente, nei sistemi di distribuzione, è però limitato ai casi in cui il trattamento dell'acqua grezza non è del tutto efficiente nell'abbattimento o quanto meno nella riduzione del numero di alghe presenti all'inizio.

Le alghe presenti nelle riserve di acqua grezza rappresentano, invece, una delle più importanti cause, accanto ad Attinomiceti e ad altri microorganismi, della produzione di odori e sapori sgradevoli [26]. Molte di esse, infatti, secernono sostanze, per la maggior parte oleose, che, liberate durante l'attività metabolica cellulare o dopo la morte, alterano le caratteristiche organolettiche dell'acqua [27].

Le alghe maggiormente implicate in questo tipo di fenomeno sono le Cianofitiche unicellulari, filamentose, coloniali ad habitat diverso, ma soprattutto planctonico. Comunque anche alghe appartenenti ad altri gruppi possono imprimere caratteristici odori e sapori all'acqua [28].

In ordine di prevalenza decrescente sono interessate alla produzione di sapori ed odori le Cianofitiche (per il 45%), le Diatomee (per il 21%), le Clorofitiche (per il 20%) e le Flagellate pigmentate (per il 14%).

In generale se le alghe sono presenti nell'acqua a basse concentrazioni l'odore aromatico da loro prodotto è piuttosto allettante ed è paragonabile a quello di particolari vegetali o fiori, mentre invece se sono presenti in numero elevato possono produrre uno sgradevole odore di pesce, di erba, di muffa o di terra.

Il numero di alghe necessario per imprimere un odore ed un gusto caratteristico all'acqua è quanto mai variabile. Questa densità può variare in funzione dei vari generi da poche decine a qualche migliaia di unità cellulari per millilitro : 30 unità / mL per *Dinobryon*, 200 unità / mL per *Symura*, 500 - 3000 unità / mL per *Asterionella* [28].

Nel 1965 e nel 1969 è stato possibile isolare due composti chimici responsabili rispettivamente dell'odore di terra e di muffa nelle acque : la geosmina ed il 2 - metil - isoborneolo (MIB) [29, 30].

La geosmina ed il MIB sono stati ritrovati ovunque nelle acque superficiali, associati alla presenza di Attinomiceti, ma anche di Cianofitiche.

E' stato visto che nell'acqua potabile un livello di geosmina superiore ai 45 ng / L comporta molte proteste da parte degli utenti, mentre a concentrazioni inferiori ai 30 ng / L il carattere organolettico impresso da questa sostanza all'acqua spesso è impercettibile [31].

Per quanto riguarda il MIB, invece, si è visto che già ad una concentrazione pari a 8 - 10 ng / L si hanno lamentele da parte dei consumatori [31].

E' stato possibile identificare le sostanze responsabili delle alterazioni organolettiche nelle acque mediante gas - cromatografia, spettrometria di massa, risonanza magnetica nucleare e spettrometria U.V. [32] e si è potuto vedere che oltre alla geosmina ed al MIB altre sostanze sono coinvolte nella produzione di odori e sapori sgradevoli nelle

acque e precisamente alcani, alcoli, idrocarburi alifatici saturi ed insaturi, aldeidi, chetoni, esteri, mercaptani e sostanze solforate [33].

E' stato osservato che nella produzione di tali sostanze si possono alternare più organismi algali nell'arco dell'anno [34].

La sintesi di sostanze che imprimono all'acqua caratteri organolettici particolari dipende anche da fattori ambientali quali la temperatura e la fase di crescita in cui si trova la popolazione algale. Infatti è stato osservato che la produzione è minima quando la temperatura si trova intorno ai 30 °C, mentre a temperature superiori ed inferiori si ha un incremento nella sintesi, che è inoltre massima durante la fase esponenziale di crescita [35].

Formazione di trialometani

Un altro problema provocato dalle alghe è rappresentato dal fatto che esse, sia la loro biomassa, sia i loro prodotti extracellulari (ECP), possono essere importanti fonti di precursori nella formazione dei trialometani durante il processo di clorazione [36, 37]. Anche esperimenti di laboratorio [38] hanno dimostrato infatti come le alghe siano in grado di reagire molto velocemente con il cloro portando alla produzione di trialometani. La capacità delle alghe di generare trialometani varia da specie a specie ed a seconda della fase di crescita in cui si trova l'alga; è stato infatti dimostrato che si ha la massima produzione durante la fase esponenziale di crescita [39].

E' stato inoltre osservato che la produzione di questi prodotti organici alogenati aumenta con l'aumentare della temperatura e del pH [37].

Per limitare la formazione dei trialometani la cosa più semplice da fare sarebbe quella di sostituire la preclorazione con altri procedimenti di preossidazione, come ad esempio quelli che implicano l'utilizzo di ozono, clorammine o permanganato [40]. La cosa migliore da fare è infatti quella di ridurre al minimo nell'acqua i precursori prima che venga aggiunto il cloro.

Problemi causati dalle alghe negli impianti di potabilizzazione

Oltre a provocare i problemi già discussi le alghe possono creare inconvenienti negli impianti di potabilizzazione, primo fra tutti l'intasamento dei filtri a sabbia [41].

Le alghe infatti riescono ad intasare indifferentemente sia i filtri di sabbia lenti che quelli rapidi.

Non è ancora ben chiaro perchè alcuni tipi di alghe siano più efficaci rispetto ad altri nel ridurre il movimento dell'acqua attraverso i filtri stessi. Una delle cause principali è senz'altro la capacità di moltiplicarsi, ma non si può escludere che vi concorrano altri fattori come ad esempio la quantità di materiale mucillaginoso che circonda le cellule di alcune alghe, soprattutto Cianoficee, la tendenza alla formazione di fiocchi come ad esempio nel caso di *Tribonema* e di *Fragilaria* o la presenza di scheletri rigidi come nel

caso delle Diatomee. A questo proposito si può dire che appartengono infatti alle Diatomee le alghe che maggiormente sono responsabili dell'intasamento dei filtri (come ad es. *Asterionella*, *Synedra*, *Tabellaria*, *Fragilaria*) [41].

Il guscio rigido che circonda le loro cellule è infatti costituito principalmente da silice e pertanto non è soggetto a decomposizione; quindi anche se le cellule delle Diatomee possono rapidamente morire sulla superficie del filtro, i loro scheletri silicei rimangono ad ostruire i pori del filtro stesso.

Per ridurre l'intasamento dei letti filtratori è pertanto raccomandabile eseguire un pretrattamento dell'acqua costituito da coagulazione e sedimentazione prima di procedere alla filtrazione.

Si è visto infatti che se la coagulazione e la sedimentazione sono efficienti si può ottenere una rimozione del 90 - 95 % delle alghe presenti inizialmente nell'acqua.

Le alghe possono anche essere implicate nella produzione di uno strato viscido in approvvigionamenti industriali di acqua [41, 42]. Responsabili di questo sono soprattutto le Cianoficee che generalmente hanno le cellule rivestite da capsule o guaine mucillaginose.

La melma prodotta dalle alghe oltre ad essere indesiderabile è anche molto pericolosa dal punto di vista igienico - sanitario in quanto può rappresentare un luogo di insediamento e di moltiplicazione di microorganismi come ad es. funghi, lieviti, protozoi e batteri, in particolare *Pseudomonas*.

Un altro problema causato dalle alghe è costituito dalla corrosione delle tubature e dei serbatoi scoperti, sia in cemento che in metallo, provocata dagli acidi carbonico, ossalico, silicico prodotti dalle alghe stesse, nonché dalla gelatina propria di alcune specie [43].

Molte alghe, siano esse appartenenti alle Cloroficee che alle Cianoficee, nonché alle Diatomee, possono inoltre crescere attaccate ai substrati [41]. Questo può avvenire non solo nei serbatoi di acqua ma anche negli stessi impianti di trattamento, dove se presenti in numero elevato le alghe possono ridurre il flusso di acqua nei canali ed aumentare la frizione sulla parete degli stessi. Una volta staccatesi dai supporti possono inoltre provocare l'intasamento dei filtri, produrre sgradevoli sapori ed odori nell'acqua, portare alla formazione di indesiderabili tappeti superficiali.

Proposte operative per il controllo delle alghe nelle acque potabili

In generale nelle tubature dei sistemi di distribuzione di acqua potabile il numero di alghe presenti non è elevato in quanto esse di solito vengono distrutte, o comunque ridotte, in parte dal cloro residuo o dalla pressione meccanica alla quale vengono sottoposte durante il trattamento di potabilizzazione dell'acqua, ed in parte dalla permanenza al buio (poche specie algali sono infatti in grado di crescere in assenza di luce).

In ogni caso la concentrazione algale nelle riserve di acqua potabile può essere controllata in diverse maniere. Per prima cosa cercando di impedire, o quanto meno

ridurre al minimo, il raggiungimento di alti livelli trofici che favoriscono il riprodursi delle alghe.

Se questo non è possibile possono essere usati come correttivi degli algicidi. Il più utilizzato è il solfato di rame, che deve essere impiegato ad una concentrazione massima di 1 mg / L per impedire la formazione di sapori sgradevoli nell'acqua stessa.

Il trattamento con solfato di rame non è però sempre il più indicato, perchè anche se sul momento può ridurre la biomassa algale, alla lunga può dar luogo ad uno sviluppo di ritorno più rapido o può essere invalidato dall'instaurarsi di forme algali resistenti.

Un adeguato trattamento delle acque che comprenda coagulazione, sedimentazione, filtrazione e disinfezione può portare ad un buon abbattimento del numero delle alghe inizialmente presenti nell'acqua grezza.

Questo trattamento non è però in generale efficace per estinguere o ridurre eventuali sapori ed odori sgradevoli di un'acqua, anzi a volte contribuisce ad aumentarli. Per questo specifico problema il sistema di rimozione più adatto è quello basato sull'adsorbimento sui carboni attivi, sia in polvere (PAC) che granulari (GAC).

In generale pertanto si può dire che per migliorare l'efficienza degli impianti di potabilizzazione sarebbe opportuno utilizzare sempre filtri a carboni attivi, che, oltre ad avere i vantaggi già descritti, porterebbero anche il beneficio di ridurre tutte le eventuali tossine prodotte dalle alghe che possono essere immesse in rete.

Alcuni studi condotti negli Stati Uniti [44] hanno dimostrato che gli utenti possono ricevere in rete un'acqua con una torbidità visibile, causata dalle alghe che eventualmente sono riuscite a superare la barriera rappresentata dall'impianto di potabilizzazione, pari a quella prodotta da 10^4 cellule dell'alga verde *Chlorella* per ml.

Per concludere si può dire che nella maggior parte delle volte la presenza delle alghe nell'acqua di rete non ha riflessi diretti sulla salute pubblica, anche se in alcuni casi, segnalati, come già detto, anche in Italia, le alghe responsabili di fioriture nei bacini di captazione sono produttrici di biotossine. Quando questo si verifica è consigliabile sospendere l'erogazione dell'acqua dall'invaso sede di tale fenomeno, oppure, se questo non è possibile, si consiglia almeno di prelevare l'acqua dagli strati limmatici più profondi che in genere non sono colpiti dal fenomeno in quanto ad essi la luce non arriva.

BIBLIOGRAFIA

1. LUND, J.W.G. The ecology of the freshwater phytoplankton. *Biol. Rev. Camb. Philosoph. Soc.* 1965, 40: 231-250.
2. MOORE, R.E. Toxins from blue-green algae. *Bio Science.* 1977, 27: 797-801.
3. SIVONEN, K., NIEMELA, S.I., NIEMI, R.M., LEPISTO, L., LUOMA, T.H. & ROSAMEN, L.A. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia.*, 1990 190: 267-275.
4. SCOTT, W.E. Occurrence and significance of toxic cyanobacteria in southern Africa. *Wat. Sci. Tech.*, 1991, 23: 175-180.
5. GERLOFF, G.C., FITZGERALD, G.P. & SKOOG, F. The mineral nutrition of *Microcystis aeruginosa*. *Am. J. Bot.* 1952, 39: 26-32.

6. LONW, P.G.J., The active constituent of the poisonous alga *Microcystis toxica* Stephens (with a note on experimental cases of algae poisoning in small animals by J.D. Smith). *So. Afr. Indust. Chem.* 1950, 4: 62-65.
7. HUGHES, E.O., GORHAM, P.R. & ZEHNDER, A. Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 1958, 4: 225-236.
8. GORHAM, P.R. Laboratory studies on the toxins produced by waterblooms of blue-green algae. *Am. J. Publ. Health.* 1962, 52: 2100-2105.
9. BISHOP, C.T., ANET, E.F.L.J. & GORHAM, P.R. Isolation and identification of the fast death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959, 37: 453-471.
10. RAMAMURTHY, J. & CAPINDALE, J.B. A new isolation and structure for the endotoxin from *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can. J. Biochem.* 1970, 48: 508-510.
11. ELLEMAN, T.C., FALCONER, I.R., JACKSON, A.R.B. & RUNNEGAR, M.T. Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* bloom. *Aust. J. Biol. Sci.* 1978, 31: 209-218.
12. ELOFF, J.N., SIEGELMAN, H.W. & KYCIA, H. Comparative study on the toxins from several *Microcystis aeruginosa* isolates. *So. Afri. J. Sci.* 1982, 78: 377 (Abstract).
13. GREGSON, R.P. & LOHR, R.R. Isolation of peptide hepatotoxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1983, 74: 413-417.
14. POON, G.K., PRIESTLEY, I.M., HUNT, S.M., FARWELL, J.K. & CODD, G.A. Purification procedure for peptide toxins from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* involving high-performance-thin-layer chromatography. *J. Chromat.* 1987, 387: 551-555.
15. GATHERCOLE, P.S. & THIEL, P.G. Liquid chromatographic determination of the cyanoginosins, toxins produced by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Chromat.* 1987, 408: 435-440.
16. KRISHNAMURTHY, T., CARMICHAEL, W.W. & SARVER E.W. Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue - green). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos - aquae*. *Toxicon.* 1986, 24: 856-873.
17. BOTES, D.P., TUINMAN, A.A., WESSELS, P.L., VILJOEN, C.C., KRUGER, H., WILLIAMS, R.H., SANTIKARN, S., SMITH, R.J. & HAMMOND, S.J. The structure of cyanoginosin -LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Chem. Soc. Perkin. Trans:* 1984, 1: 2311-2318.
18. CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins (A review). *J. Appl. Bacter.* 1992, 72: 445-459.
19. FALCONER, J.R., JACKSON, A.R.B., LANGLEY, J. & RUNNEGAR, M.T.. Liver pathology in mice in poisoning by the blue - green alga *Microcystis aeruginosa*. *Aust. J. Biol. Sci.* 1981, 34: 179-187.
20. OSTENSVIK, O., SKULBERG, O.M. & SOLI, N. Toxicity studies with blue - green algae from Norwegian waters. In: *The water environment: algal toxins and health.* W.W. Carmichael (Ed.). Plenum Press, New York. 1982, pp. 315-324.
21. LINDHOLM, T. & ERIKSSON, J.E. Nuisance algae and fish kills in Alandian freshwater reservoirs. *Ymparisto ia Terveys.* 1985, 1: 41-44.
22. ERIKSSON, J.E., MERLUOTO, J.A.O., KUJARI, H.P. & SKULBERG, O.M. A comparison of toxins isolated from the cyanobacteria *Oscillatoria aghardii* and *Microcystis aeruginosa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1988, 89 C: 207-210.
23. BERG, K., WIMAN, J., CARMICHAEL W.W. & DABHOLKAR, A. Isolated rat liver perfusion studies with cyclic heptapeptide toxins of *Microcystis* and *Oscillatoria*. (freshwater Cyanobacteria). *Toxicon.* 1988, 26: 827-837.
24. LIPPI, E.C. & ERB, J. 1976. Gastrointestinal illness at Sewickley, Pennsylvania. *J.A.W.W.A.* 68: 606-610.
25. CARMICHAEL, W.W., JONES, C.L.A., MAHMOOD, N.A. & THEISS, W.C. Algal toxins and water-based diseases. *CRC Critical Reviews in Environmental Control.* 1985, 15: 275-279.

26. ANSELME, C., MALLEVIALLE, J. & BORDET, J.P. Utilisation du profil de flaveur pour la caractérisation des qualités organoleptiques des eaux potables. *La Trib. Cebedeam*. 1987, 522: 3-16.
27. SILVEY, J.K., HENLEY, D.E. & WYATT, J.T.. Growth and odor - production studies. *J.A.W.W.A.* 1972, 64: 35-39.
28. BARNETT, R.H. Research on control of taste and odor producing algae in surface reservoirs. *Proc. Am. Wat. Wks. Ass. Wat. Qual. Tech. Conf.*, Dec. 2-5, 1983.
29. GERBER, N.N. & LECHEVALIER, H.A. Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from Actinomycetes. *Appl. Microbiol.* 1965, 13: 935-938.
30. IZAGUIRE, G., HWANG, C.J., KRASNER, S.W. & MC GUIRE, M.J. Production of 2 - methyl - isoborneol by two benthic Cyanophyta. *Wat. Sci. Tech.* 1983, 15: 211-220.
31. HWANG, C.J., KRASNER, S.W., MC GUIRE, M.J., MOYLAN, M.S. & DALE, M.S. Determination of nanogram per liter levels of earthy -musty odorants in water by the salted closed-loop stripping method. *Environ. Sci. Tech.* 1984, 18: 535-539.
32. YANO, H., NAKAHARA, M. & ITO, H. Water blooms of *Uroglena americana* and the identification of odorous compounds. *Wat. Sci. Tech.* 1988, 20: 75-80.
33. JENKINS, D., MEDSKER, L.L. & THOMAS, J.F. Odorous compounds in natural waters. Some sulfur compounds associated with blue-green algae. *Environ. Sci. Tech.* 1967, 1: 731-735.
34. YAGI, M. Musty odour problems in Lake Biwa 1982-1987. *Wat. Sci. Tech.* 1988, 20: 133-142.
35. WU, J.T. & JUTTNER, F. Effect of environmental factors on geosmin production by *Fischerella muscicola*. *Wat. Sci. Tech.* 1988, 20: 143-148.
36. JOYCE, W.S., DI GIANO, F.A. & UDEN, P.C. THM precursors in the environment. *J.A.W.W.A.* 1984, 76: 102-106.
37. OLIVER, B.G. & SHINDLER B.D. Trihalomethanes from the chlorination of aquatic algae. *Environ. Sci. Tech.* 1980, 14: 1502-1505.
38. HOEHN, R.C., BARNES, D.B., THOMPSON, B.C., RANDALL, C.W., GRIZZARD, T.J. & SHAFFER, P.T.B. Algae as sources of trihalomethane precursors. *J.A.W.W.A.* 1980, 72: 344-349.
39. WARDLAW, V.E., PERRY, R. & GRAHAM, N.J.D. The role of algae as trihalomethane precursors - a review - *J. Water SRT - Aqua*. 1991, 40: 335-345.
40. PETERS, C.J. & PERRY, R. The formation and control of trihalomethanes in water treatment processes. *Wat. Sci. Tech. (Suppl.)*. 1981, 13: 103-123.
41. PALMER, C.M. Algae in water supply. pub. 657. *U.S. Public Health Service*. Washington, D.C.
42. SMITH, A.W. 1972. Plankton enumeration and evaluation. *J.A.W.W.A.* 1962, 64: 67-73.
43. MYERS, H.C. The role of algae in corrosion. *J.A.W.W.A.* 1947, 49: 322-325.
44. KAY, G.B., SYKORA, J.L., & BURGESS, R.A. Algal concentration as a quality parameter of finished drinking waters in and around Pittsburg, Pennsylvania. *J.A.W.W.A.* 1980, 72: 170-175.

MICRO E MACROINVERTEBRATI NELLE ACQUE POTABILI

Irene Di Girolamo

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'Organizzazione Mondiale della Sanità, nel tracciare le linee guida per le acque potabili rimarca, la presenza nelle reti idriche di numerosi organismi che pur non avendo rilevanza per la salute umana sono tuttavia indesiderabili poiché producono torbidità, odori o sapori o perché possono apparire nelle acque, mostrandosi quali tipici animali delle acque dolci. Viene inoltre ribadito che al di là dei problemi estetici, la presenza di tali organismi indica che il trattamento delle acque e/o il livello di manutenzione dell'impianto sono insufficienti [1].

La fauna (o faunula) presente nelle reti di distribuzione delle acque potabili è piuttosto variata e comprende sia micro che macroinvertebrati (differenziati solo in base a dimensioni rispettivamente minori o maggiori di 1 mm).

Malgrado a prima vista gli ambienti delle reti acquedottistiche possano risultare inospitali per gli organismi animali, essi in realtà accolgono frequentemente una ricca faunula di invertebrati. Infatti molti sono i gruppi che si sono adattati a questi particolari habitat e anzi alcuni di essi mostrano spesso popolazioni stabilmente insediate all'interno delle reti di distribuzione delle acque potabili, nonostante i molti elementi negativi che caratterizzano, sotto l'aspetto ecologico, questi ambienti. Fattori quali l'assenza di luce, la turbolenza delle acque o la presenza di sostanze disinfettanti non sono infatti, malgrado le apparenze, sufficienti ad escludere la possibilità di sopravvivenza di organismi superiori.

Aspetti faunistici

I gruppi animali segnalati con maggiore frequenza nelle reti sono riportati nella tabella che segue (Tab.1).

La distribuzione e l'abbondanza relativa dei diversi taxa nelle reti variano geograficamente e risentono poi di vari fattori quali il tipo di acque che vengono captate, la tipologia delle condutture, il loro stato di conservazione.

Gli organismi possono poi essere presenti nei diversi stadi vitali, a seconda dei taxa.

La prima segnalazione di organismi animali in reti acquedottistiche risale al 1915 e si riferiva ad una infestazione di Insetti (Ditteri Chironomidi) in una riserva di acqua potabile a Boone, nello Iowa (USA) [2]. Da allora molti sono gli episodi riportati dalla letteratura in diversi Paesi: in generale con maggiore frequenza vengono segnalati Nematodi e Ditteri Chironomidi. Tuttavia non di rado viene riportata la presenza di altri gruppi di invertebrati nelle acque di rete.

Tabella 1. - *Gruppi animali segnalati con maggiore frequenza nelle reti di distribuzione di acque potabili.*

PROTOZOI	FLAGELLATI		
	CILIATI		
	TECAMEBE		
METAZOI	CELEENTERATI		
	ANELLIDI	Oligocheti	
	ROTIFERI		
	NEMATODI		
	ARTROPODI	Crostacei	Copepodi Isopodi Anfipodi Acari Ditteri
		Aracnidi	
		Insetti	
	MOLLUSCHI	Gasteropodi	
		Bivalvi	

A titolo di esempio:

- le specie di Copepodi del genere *Canthacamptus* rappresentano i taxa dominanti nelle reti idriche di Zurigo [3];
- *Asellus aquaticus* (Crostaceo Isopode) è segnalato spesso nelle reti di distribuzione di Parigi [4];
- le Idre (Celenterati Idrozoi) hanno dato in passato problemi agli impianti di filtrazione di Detroit [5] e di Chicago [6];
- il Mollusco Bivalve *Dreissena polymorpha* ha causato molti problemi negli impianti inglesi [7];
- Crostacei Copepodi di tre generi diversi sono frequentemente segnalati negli effluenti dei filtri a sabbia e nelle reti di moltissimi impianti localizzati sia in America che in Europa, Italia compresa [8, 9, 10, 11].

Presenze occasionali - infestazioni

Negli studi sulla presenza di invertebrati in acque di rete si distingue tra presenze occasionali ed infestazioni: nel primo caso gli organismi vivono di norma nelle acque che alimentano gli acquedotti e possono venire trasportati all'interno delle reti dal flusso della corrente. Le infestazioni sono invece a carico di organismi che danno luogo a colonie e/o popolazioni stabili all'interno delle reti, crescendo e riproducendosi all'interno di esse.

Conoscere con certezza la provenienza degli invertebrati rinvenuti nelle reti è molto difficile e si può procedere solo con processi deduttivi, considerando di volta in volta le diverse situazioni, sia sotto il profilo faunistico che sotto quello impiantistico. In generale tuttavia è possibile definire le situazioni più frequenti: nel caso in cui il rinvenimento di invertebrati sia occasionale, sia localizzato a valle dei sistemi di filtrazione e se gli organismi rilevati nelle reti (normalmente in questi casi si tratta di Rotiferi, Copepodi o Nematodi) siano presenti anche nelle acque in entrata è verosimile ipotizzare la loro

sopravvivenza ai processi di filtrazione; d'altra parte la resistenza di alcuni invertebrati (Nematodi) all'intero processo di potabilizzazione è stata dimostrata anche sperimentalmente [12].

Sempre nel caso di presenze occasionali, qualora gli invertebrati riscontrati in rete non siano stati rilevati né nelle acque grezze né a valle dei filtri, si può supporre: a) che gli invertebrati, soprattutto se si tratta di taxa tipici di ambiente interstiziali, siano penetrati nelle reti in occasione di interventi di manutenzione; b) che gli impianti di trattamento non siano protetti a sufficienza, in particolare nella sezione dei filtri e/o delle vasche di accumulo. In questi casi in rete vengono prevalentemente rilevate larve di Insetti alati, che avevano precedentemente deposto le loro uova nelle sezioni non protette dell'impianto.

Nel caso in cui invece il rilevamento di organismi in acque di rete avvenga regolarmente, è corretto ipotizzare la presenza di popolazioni stabilmente insediate all'interno delle condutture, la cui esistenza è evidentemente correlata alla costante disponibilità di adeguate risorse trofiche. Queste possono talvolta provenire dall'ambiente esterno, quando ad esempio la sostanza organica disciolta e particolata non viene trattenuta durante i processi di filtrazione, oppure, ed è il caso più frequente, le risorse alimentari sono disponibili direttamente sulle pareti interne delle condutture. Qui infatti si possono sviluppare biofilms di origine microbica che nel tempo evolvono aumentando di spessore e trasformandosi in biofouling. Su questi aggregati batterici si insediano via via vari organismi che danno luogo, alla fine del processo di colonizzazione, ad una complessa rete trofica: prima gli Attinomiceti, i funghi filamentosi ed i lieviti, quindi Diatomee, Cianoficee, Cloroficee, Protozoi e Metazoi.

E' proprio grazie alla presenza di queste incrostazioni che gli invertebrati possono essere presenti con popolazioni stabili, la cui densità e durata dipendono in larga misura da fattori specie-specifici (adattabilità, capacità riproduttiva, presenza di forme quiescenti, ecc.) [13,14]

Implicazioni igienico-sanitarie

I problemi legati alla presenza di micro e macroinvertebrati nelle reti acquedottistiche riguardano principalmente la salute pubblica ma non vanno trascurati gli aspetti legati allo scadimento della qualità delle risorsa idrica. Soprattutto questi ultimi sono generalmente da mettere in relazione alla presenza di infestazioni all'interno delle condotte. Infatti gli invertebrati possono produrre sostanze che causano odori e sapori sgradevoli oppure che comportano fenomeni di colorazione delle acque in distribuzione.

Inoltre è possibile, ed è stato segnalato ripetutamente anche nel nostro Paese, che alcuni esemplari, o parti di questi, fuoriescano dai rubinetti, creando non pochi problemi alla credibilità per gli Enti gestori delle reti.

I rischi per la salute pubblica correlati alla presenza di popolazioni animali nelle reti sembrano essere essenzialmente correlati alla possibile ingestione da parte degli invertebrati di batteri enterici, che verrebbero così ad essere protetti dalla disinfezione e a

superare indenni tutti i processi di potabilizzazione normalmente in uso. Tuttavia uno studio dettagliato effettuato sull'associazione tra batteri e invertebrati in una rete di distribuzione americana [2] ha dimostrato che i batteri isolati dagli invertebrati presenti nelle condutture non appartenevano al gruppo dei coliformi, anche quando i coliformi erano presenti nelle acque potabili da cui provenivano gli invertebrati. Nella realtà quindi il rischio legato alla veicolazione di patogeni da parte di invertebrati potrebbe essere del tutto potenziale.

Situazione italiana

In Italia solo raramente sono stati effettuati studi faunistici sulle comunità di invertebrati presenti nelle reti di distribuzione idrica [11, 15, 16].

Più frequenti sono invece le segnalazioni di episodi di contaminazione da parte di singoli taxa, solitamente i Nematodi [17, 18, 19]. Va tuttavia messo in evidenza che tutte le specie di questo gruppo finora repertate nelle acque destinate al consumo umano nel nostro Paese sono esclusivamente specie a vita libera e non presentano quindi alcun rischio diretto per la salute umana.

La normativa italiana sulle acque potabili (DPR 236/88) [20], prevede, tra i parametri da prendere in considerazione nei controlli di tipo C4 (occasionalmente), la ricerca degli Elminti. La genericità dell'espressione "Elminti" e l'assenza di un metodo di analisi standardizzato hanno creato in questi ultimi anni alcuni problemi. Infatti il termine "Elminti", privo di alcun preciso significato nella tassonomia zoologica, venne utilizzato inizialmente per indicare vari animali (o stadi di animali) dall'aspetto vermiforme che non parevano possedere caratteri distintivi tali da includerli in altri gruppi zoologici.

Attualmente, nell'applicazione della normativa, è diventato usuale indicare con il termine Elminti i Nematodi, che sono di norma gli unici "vermi" ad essere rilevati in campioni di acque potabili.

Gli episodi di contaminazione di acque potabili da parte di Nematodi, se pure come già accennato, non rappresentano, almeno in Italia, un effettivo rischio per la salute pubblica, vanno tuttavia analizzati accuratamente, al fine di valutare con esattezza la serietà del fenomeno ed eventualmente limitare l'entità del problema igienico-sanitario.

In questa ottica si sono recentemente mossi esperti dell'Istituto Superiore di Sanità, chiamati ad intervenire nella valutazione dei rischi connessi alla presenza di Nematodi in una rete di distribuzione dell'Italia centrale. In questo caso, reso particolarmente grave dal fatto che erano state emesse ordinanze di divieto di utilizzazione delle acque a scopo potabile, si è proceduto dapprima ad una verifica del funzionamento dell'intero impianto di potabilizzazione ed ad un'accurata analisi microbiologica e faunistica delle acque prelevate in vari punti dell'impianto e della rete di distribuzione.

In un secondo tempo, sulla base dei risultati delle varie analisi, accertata l'assenza di batteri patogeni e/o di organismi parassiti, si è valutato attentamente il rischio igienico-sanitario derivante dal consumo delle acque in esame. Dal momento che tale rischio è stato ritenuto minimo, ci si è orientati verso la revoca delle ordinanze di divieto, ferma

restando tuttavia la necessità di eseguire routinariamente un approfondito monitoraggio microbiologico teso ad escludere, in qualsiasi momento, la contemporanea presenza di Nematodi e di batteri patogeni.

L'emergenza igienico-sanitaria conseguente alla contaminazione descritta ha delineato con chiarezza la necessità di individuare e mettere a punto tecnologie adatte alla rimozione degli invertebrati dalle acque destinate al consumo umano. Dal momento che i disinfettanti, alle concentrazioni normalmente utilizzate, non hanno effetti rilevanti sulla vitalità di questi organismi, gli unici sistemi utili per la loro rimozione sembrano essere quelli basati sulla filtrazione: tra questi i più interessanti appaiono quelli "a Diatomee" (Diatomeaceous Hearth Filtration), già utilizzati con successo in altri Paesi per la rimozione delle cisti di *Giardia* dalle acque destinate al consumo umano [21].

Un impianto pilota che utilizza filtri a Diatomee è stato montato nell'impianto di potabilizzazione dell'acquedotto in esame ed i risultati che emergono dal suo esercizio vengono via via sottoposti alla valutazione degli esperti dell'I.S.S.; i dati preliminari finora ottenuti sono positivi ed accrescono l'interesse verso questo sistema di trattamento. Va infatti ricordato che oltre alla rimozione dei Nematodi, per cui viene al momento testato, il sistema di filtrazione a Diatomee ha già dimostrato una notevole efficacia nell'eliminazione dalle acque delle cisti di *Giardia*, che attualmente rappresentano, assieme alle oocisti di *Cryptosporidium*, il maggiore fattore di rischio igienico-sanitario connesso al consumo di acque potabili.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO. *Guidelines for drinking water quality 2nd ed. - v.1. Recommendation*. World Health Organization, Geneve. 1993.
2. LEVY, R.V., HART, F.L., CHEETHAM, R.D. Occurrence and public health significance of invertebrates in drinking water system. *Journal A.W.W.A.* (Sept. 1986): 105-110.
3. AEPPLI, J. Appearance of invertebrates in slow sand filters and reservoirs of the Zurich water supply. *Aqua*, 1990, 39: 48-55.
4. BOET, P. Mises a point sur la biologie du Crustacé Isopode *Asellus aquaticus* et sur le moyens de son eradication dans le réseaux de distribution d'eau potable. *Rev. Franc. Sciences de l'eau*, 1984: 93-110.
5. HUDGINS, B.. Turbidity, Plankton and Mineral Content of Detroit Water Supply. *Jorn. A.W.W.A.*, 1931, 23: 435.
6. BAYLIS, J.R. Microorganism that have caused trouble in Chicago Water System. *Pure Water*, 1957, 9:47.
7. INGRAM, W.M. Snail and Clam infestation of drinking water supplies. *Jorn. A.W.W.A.*, 1956, 43: 258.
8. KELLY, S.N. Infestation of the Norwick, England, Water System. *Jorn. A.W.W.A.*, 1955, 42: 330.
9. GERARDI, M.H., GRIMM, J.K. Aquatic Invaders. *WATER, Engineering and Management*, Oct. 1982: 22-23.
10. LUCZAK, J., RYBAK, M., RANKE-RYBICKA, B. Aquatic organisms present in tap water. *Roczn. Pzh.*, 1980, 31(3): 319-325.
11. DOMENICHINI, G., MOLINARI, F. *Artropodi delle acque potabili*. Atti 1° Convegno Accademia Italiana di Entomologia, 1984: 165-185.

12. TOMBES, A.S., ABERNATHY, D.H. The relationship between rainfall and nematode density in drinking water. *Water Res.* 1979, 13: 619-622.
13. AULICINO, F.A., ORSINI, P. La ricrescita batterica in reti idriche e aspetti igienico-sanitari. *Ann. Ig.*, 1994, 6: 861-866.
14. SMALL, I.C., GREAVES, G.F. A Survey of Animals in Distribution System. *Journ. Water Trtmt. & Exam.*, 1968, 19: 150-155.
15. QUADRI, G. *Ricerche sull'inquinamento biotico delle acque potabili urbane*. Tesi di Laurea in Sc. Biologiche, Università degli studi di Parma, 1985.
16. BURRINI, D., LUPI, E. Potabilizzazione di acque superficiali: influenza dei trattamenti sulla presenza di metazoi. *Atti "Acque ad uso potabile" Centro Scientifico Internazionale, Milano 1993*, 249-262.
17. BONETTI, F., TIMPIERI, A. Su un episodio di contaminazione di un acquedotto civico da parte di nematodi del genere *Mononchus* (Bastian, 1965). *Ann. SCLAVO*, 1968, 10: 410-423.
18. GALLO, L., POLI, P., SARTORI, R. Rapporto sulla presenza di elminti in acque potabilizzate. *Ambiente, Risorse e Salute*, Giugno 1993: 38-40.
19. DI GIROLAMO, I., BEZZICCHERI, G., BONADONNA, L., ERCOLESSI, E., TROTTA, I., OTTAVIANI, M. Nematodi in acque potabili: analisi di un caso italiano. *Annali di Igiene, Medicina Preventiva e di Comunità*, 1995, 7 (4): in press
20. DECRETO PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA 24 Maggio 1988, n. 236. Attuazione della direttiva CEE concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, ai sensi dell'art. 15 della legge 16 aprile 1987, n. 183. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, 30 giugno 1988.
21. ONGERTH, J.E. Evaluation of a treatment for removing *Giardia* cysts. *Journ. A.W.W.A.*, 1990, 82: 85-96.

TECNICHE DI CAPTAZIONE DELLE ACQUE A SCOPO POTABILE

Anna Santarsiero

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Premessa

La legge n.319/76 [1] (norme per la tutela delle acque dall'inquinamento) distingue i seguenti corpi idrici [2]:

- a) laghi e serbatoi,
- b) corsi d'acqua naturali ed artificiali,
- c) acque di transizione,
- d) acque costiere,
- e) falde acquifere sotterranee.

Ai fini potabili possono essere utilizzate le acque superficiali di cui ai punti a) e b) e le acque di sottosuolo di cui al punto e) oltre naturalmente le sorgenti.

La normativa vigente, carente per le acque di sottosuolo e sorgenti, fronteggia il progressivo crescente inquinamento delle acque superficiali con l'adozione di processi di potabilizzazione che consentono di trasformare le acque superficiali, appartenenti alle categorie A1, A2 e A3 individuate dal D.P.R 515/82 [3], in acqua potabile [4]. Tuttavia, una razionale captazione dell'acqua richiede che essa sia prelevata dal suo ambiente naturale, che ne sia regolata la sua distribuzione quantitativa nel tempo, che ne vengano trattate le caratteristiche di qualità per adattarle al tipo di destinazione (impianto di potabilizzazione e/o acquedotto).

Le tecniche di captazione da adottare per le suddette funzioni richiedono la realizzazione di opere idrauliche sommariamente raggruppabili in: opere di presa da acque superficiali ed opere di presa da acque sotterranee [5].

Captazione di acque superficiali

Le opere di presa da acque superficiali correnti (rivi, torrenti, fiumi) sono in via generale legate ad un'opera di sbarramento attraverso il corso d'acqua (traverse fluviali) ovvero ad un'opera di regolazione (invaso artificiale): in tal caso l'opera di presa è parte complementare dell'opera principale che è il trattamento della qualità dell'acqua e la sua distribuzione senza variazioni quali-quantitative.

Le opere di presa da acque superficiali ferme (a queste, generalmente vengono assimilate le acque per la cui presa non sia necessario provvedere ad un'opera di sbarramento: acque lacuali, acque marine ecc.) sono realizzate mediante immissione nello specchio d'acqua del pescante di una pompa, ovvero mediante un'opera subacquea

attraverso la quale possa prelevarsi l'acqua a sufficiente distanza dalla riva ed a profondità tale da garantire i requisiti di qualità richiesti dal D.P.R n.515/82.

Nel caso di lago (naturale o non), le acque sono meno ricche di sostanze sospese, ma le variazioni della temperatura e del livello del lago nel corso dell'anno, il lago si riempie durante i periodi di piena, richiedono che le opere di presa siano costituite da una torre di presa munita di parecchie luci disposte a profondità diverse e manovrabili dall'alto come ne dà idea la Figura 1.

Nel caso di captazione delle acque di un fiume, lo sbarramento fluviale (Figura 2) è strettamente legato all'opera di presa che deve normalmente comprendere le seguenti parti:

- una o più luci di immissione in una vasca di calma, (le luci sono munite di griglie e paratoie di intercettazione);
- uno o più elementi per la sedimentazione (muniti di scarico);
- uno o più organi di regolazione e di misura;
- opere di immissione nella derivazione (canale o tubazione).

Opere di presa da sorgenti

Accertata, anzitutto, la validità della sorgente attraverso la serie di indagini e di misura, queste ultime quanto più possibile prolungate nel tempo, riguardante:

- le portate media, minima, massima ed il regime idrologico;
- le caratteristiche chimiche e batteriologiche dell'acqua e le loro variazioni;
- il regime termico;
- la delimitazione del bacino di alimentazione;
- la sistemazione dell'opera di presa dipende dal tipo di sorgente.

I tipi più comuni sono i seguenti:

- sorgenti di emergenza: l'acqua emerge dal fondo alla superficie del suolo, le variazioni del livello freatico sono notevoli e le sorgenti possono anche scomparire;
- sorgenti di trabocco: l'acqua di una riserva sotterranea si versa all'esterno quasi per "troppo pieno". Ad esse possono assimilarsi anche le sorgenti cosiddette di sbarramento impermeabile contro una formazione permeabile;
- sorgenti di contatto: l'acqua contenuta in una formazione permeabile, sgorga naturalmente lungo il contatto con una formazione impermeabile;
- sorgenti di fessura: l'acqua sgorga attraverso una fessura più o meno ampia in rocce permeabili per fratturazione o per porosità. Alle sorgenti di fessura sono da ascrivere le sorgenti carsiche. In rocce solubili l'acqua trasforma le fessure in caverne, grotte, cunicoli.

Il concetto fondamentale dell'opera di presa da una sorgente deve essere quello di raccogliere la maggiore quantità di acqua sorgiva, isolandola da acque di diversa origine e soprattutto superficiali.

Le opere di presa variano a seconda che si tratti di sorgenti che affiorano attraverso terreni coerenti o terreni incoerenti. Nel primo caso la roccia va ripulita da eventuali detriti; si costruirà poi l'opera di presa che è costituita generalmente da una prima vasca di calma munita di scarico di fondo e dalla vasca di presa, collegata alla prima attraverso uno stramazzo (Figura 3), da cui si diparte la tubazione. L'insieme delle vasche alle sorgenti dal punto di vista strettamente igienico sanitario debbono avere:

- degli scarichi di fondo che permettano di svuotarle, deviando opportunamente le acque della sorgente, allo scopo di effettuare le periodiche pulizie ed eventuali incidenti di inquinamenti;
- uno scarico di troppo pieno commisurato alla portata massima della sorgente, munito di opportuna chiusura idraulica per impedire l'ingresso di animali, lo scarico di troppo pieno sfioratore deve funzionare automaticamente in modo da evitare qualsiasi rigurgito alla sorgente nel caso in cui si arresti il flusso della condotta di presa e non si sia aperto in tempo lo scarico di fondo;
- una presa dell'acqua fatta con tubazione o con canale a pelo libero;
- un dispositivo di misura della portata della sorgente.

La vasca di calma, con funzione di dissabbiatore, deve avere una lunghezza tale che la velocità dell'acqua in essa non superi i 10-20 cm/sec.

Nel caso di acque con tendenza ad asportare le sabbie della formazione geologica dalla quale sgorgano, è opportuno disporre di un vespaio costituito da pietrame e pietrisco di dimensioni decrescenti in modo da evitare che la sabbia sia asportata.

In caso di acquedotto alimentato da più sorgenti spesso vicine tra loro, le condotte che partono dai diversi bottini di presa addurranno le acque ad un unico bottino di riunione o camera di raccolta anche essa munita di dispositivo per la misura delle acque e da cui parte l'acquedotto esterno.

Nel caso di terreni incoerenti che ricoprono la vera sorgente, questa va raggiunta attraverso un cunicolo: gallerie e cunicoli sono comunque utili in ogni caso per l'allacciamento dei vari punti di affioramento dell'acqua qualunque sia la natura della sorgente.

Opere di presa da falde

Quando le acque sotterranee non affiorano spontaneamente alla superficie del suolo esse vengono raggiunte con opere di captazione che possiamo suddividere in: pozzi, gallerie. I pozzi rappresentano il mezzo più semplice e più largamente usato per la ricerca e lo sfruttamento delle acque sotterranee. Si hanno pozzi freatici (o normali) quando la falda raggiunta è di tipo freatico cioè è delimitata superiormente da una superficie libera (idrostatica o piezometrica), si hanno invece pozzi artesiani quando la falda che essi raggiungono (falda artesiane) è contenuta in strati impermeabili ed è pertanto dotata di una certa pressione. Nel primo caso (pozzi freatici) l'acqua si mantiene se non emunta, al livello freatico (o piezometrico); nel secondo risale anche al di sopra del terreno, a seconda della pressione della falda. Quando si emunge acqua da un pozzo, il livello si

abbassa, la falda circostante si deprime fino a formare una specie di imbuto (area di influenza); quando più pozzi agiscono in una medesima area occorre che le aree di influenza non si compenetrino, se non marginalmente. I pozzi vengono distinti a seconda delle metodiche di costruzione in pozzi a scavo ed in pozzi tubolari. I pozzi a scavo (Figure 4 e 5), vengono realizzati ad anelli di cemento armato, in presenza di sottosuoli sciolti; ed a muratura in blocchi od in calcestruzzo (sottomurazione), nei sottosuoli compatti e rocciosi. Nei due tipi di pozzi la profondità viene spinta alcuni metri sotto il limite superiore dell'acquifero. La superficie di captazione viene accresciuta mediante la creazione di cunicoli, di intercettazione che si dipartono a raggiera dal fondo. Le pareti del pozzo e gli eventuali cunicoli, in corrispondenza della falda, sono resi permeabili mediante l'uso di mattoni forati o la costruzione di muri con pietrame a secco. Il sollevamento si effettua di regola mediante elettropompe. I pozzi tubolari si ottengono mediante l'affondamento nel sottosuolo di tubi metallici. Le gallerie drenanti (pozzi a scavo orizzontali) intercettano falde acquifere sospese o poggianti su substrato sedimentario educendo portate di notevole entità. Le gallerie drenanti iniziano generalmente dal piano di campagna e si addentrano nel sottosuolo con cunicoli orizzontali fino ad intercettare la falda. Le pareti delle gallerie con funzione di trasporto vengono rivestite in muratura nei punti costituiti da materiali scarsamente coerenti o da rocce laviche diffusamente fratturate; sono invece lasciate a roccia viva in corrispondenza di banchi lavici compatti che non comportano problemi di stabilità. Lungo i tratti di gallerie con funzione di eduazione viene generalmente realizzato un canale in cemento per impedire all'acqua di disperdersi nel sottosuolo lungo il tragitto. Se l'andamento del terreno non consente che una galleria venga prolungata, è necessario disporre all'estremità, a valle della galleria, un pozzo nel quale vengono collocate le pompe atte a ricondurre l'acqua ad una vasca sopraelevata a castello di carica. La Figura 6 mostra un dispositivo di questo genere, nel quale le pompe sono situate ad una certa profondità sotto il suolo.

Bibliografia

1. G.U. della Repubblica Italiana n.141 del 29-5-76.
2. G.U.della Repubblica Italiana n.48 del 21-2-77.
3. G.U.della Repubblica Italiana del 7-5-82.
4. G.U.della Repubblica Italiana n.60 del 30-6-88.
5. SANTARSIERO, A. Le Acque Potabili: dall'Attingimento all'Utilizzo. In: Atti del Corso di Aggiornamento: *Impianti di Captazione*, presentato da ULSS n. 30 (Regione Veneto), Rovigo, 18-20 Marzo 1992. Piccin (Ed.), 1992, p. 83-95 .

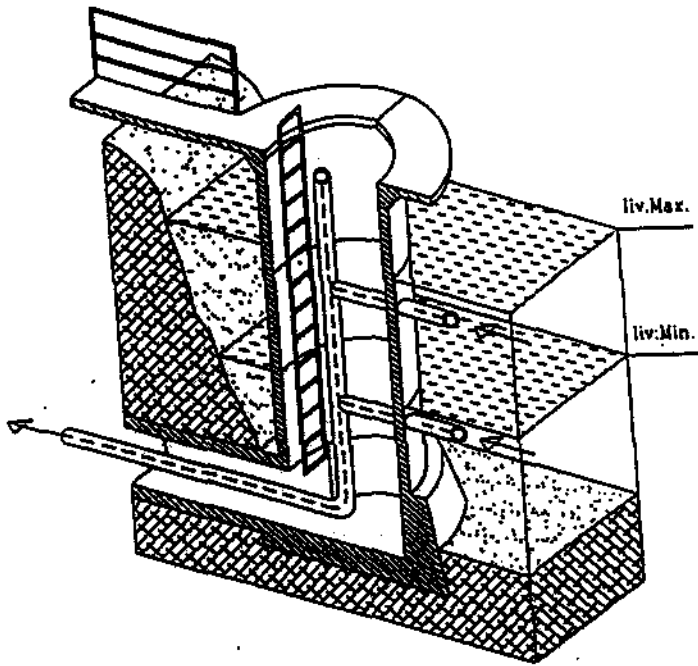


Figura 1. - Opera di presa da acque ferme munita di luci a diverse profondità

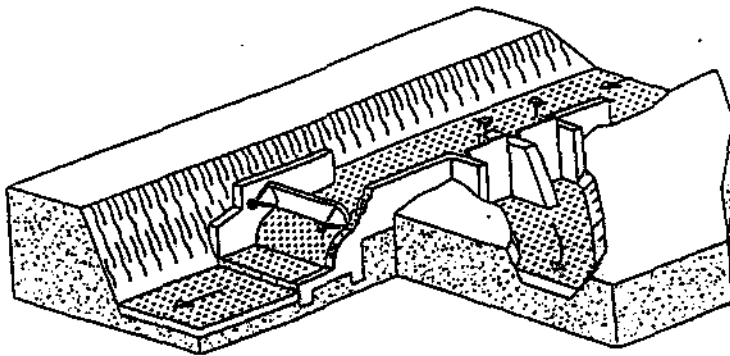






Figura 2. - Traversa fluviale

Legenda

- | | |
|---|---------------------|
|  | Roccia permeabile |
|  | Sabbia |
|  | Roccia impermeabile |
|  | Acqua |

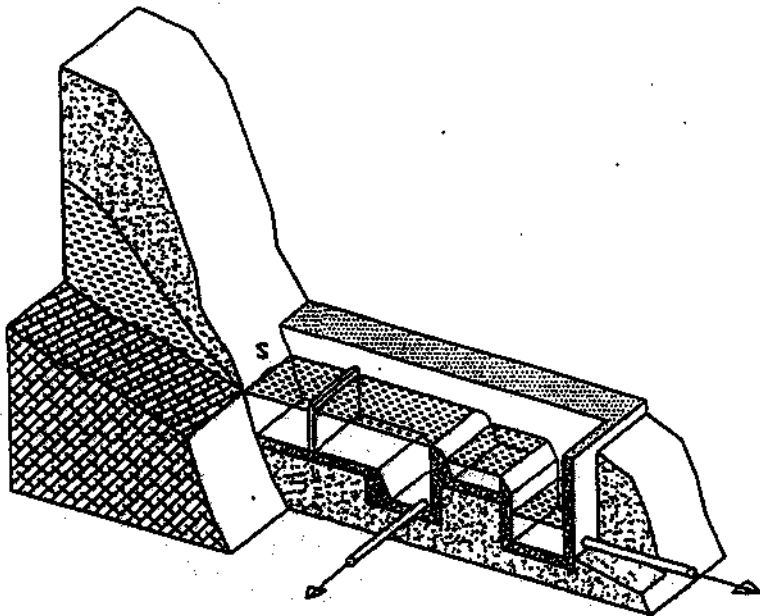
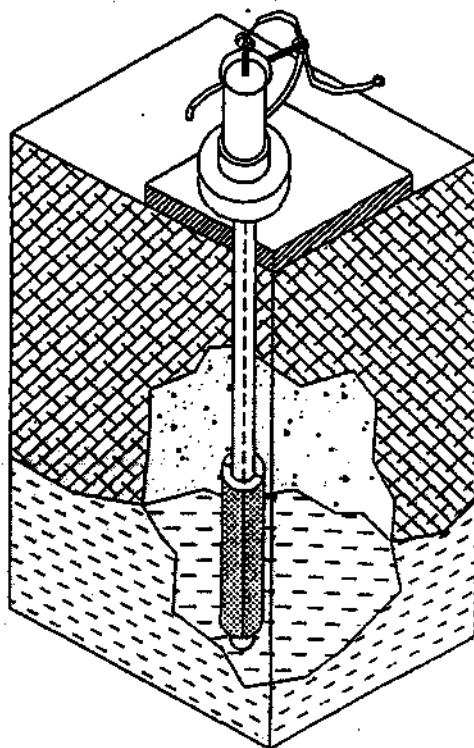


Figura 3. - Schema di opera di presa



Legenda


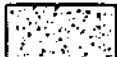


-  Roccia permeabile
-  Sabbia
-  Roccia impermeabile
-  Acqua

Figura 4. - Pozzo tubolare

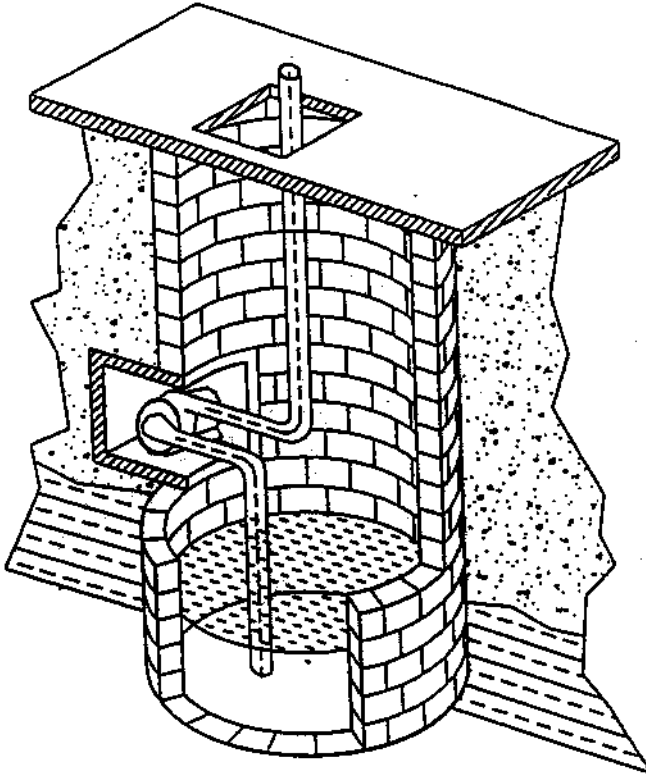
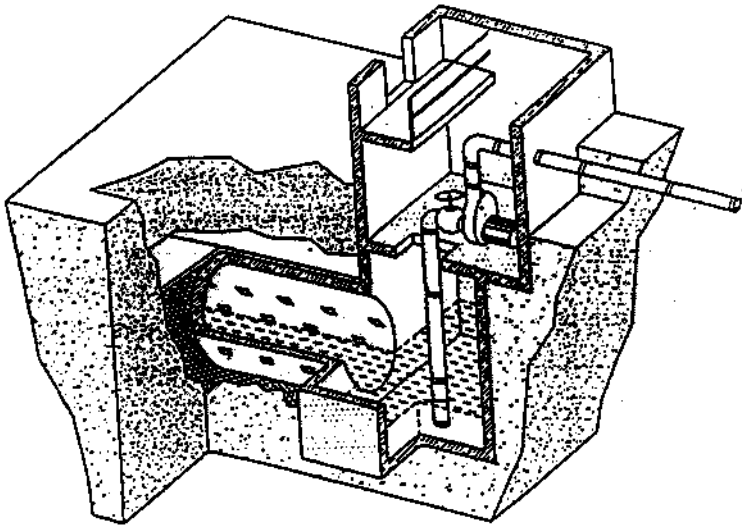


Figura 5. - Pozzo a scavo: in muratura



Legenda





-  Roccia permeabile
-  Sabbia
-  Roccia impermeabile
-  Acqua

Figura 6. - Galleria drenante (corredata di pozzo)

OTTIMIZZAZIONE E CONTROLLO DEL PROCESSO DI DISINFEZIONE

Ivo Fagherazzi, Gianni Andreottola, Giuliano Ziglio

Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale, Università degli Studi di Trento

1. Introduzione

L'acqua potabile distribuita al consumo umano deve essere "sicura" per quanto concerne la trasmissione di agenti patogeni potenzialmente presenti. Ciò si dimostra tramite la costante assenza degli indicatori fecali (E. coli, Coliformi fecali, Coliformi totali). Questa metodologia di controllo è applicata alle acque grezze al fine di esprimere un giudizio sullo stato di qualità della risorsa e per valutare, in caso di positività degli indicatori, i processi di trattamento a cui deve essere soggetta, ma viene ulteriormente estesa per quanto riguarda le caratteristiche dell'acqua destinata al consumo umano. E' richiesto che i coliformi fecali siano sempre assenti in un campione di 100 mL di acqua, che il pH si compreso fra 6.5 e 8.5 e che la temperatura sia fra 12 e 25°C. Non esistono a livello nazionale norme, disposizioni o raccomandazioni tecniche relative ai processi di potabilizzazione. In particolare per quanto si riferisce alla disinfezione i parametri chiave del processo (disinfettante residuo, pH, temperatura, torbidità etc.) nella fase di sorveglianza e monitoraggio sono valutati in modo individuale, sia nella filiera di trattamento che sull'acqua all'uscita dell'impianto. Tale metodologia non può essere utilizzata per valutare l'efficienza del processo di disinfezione in quanto tali parametri, presi singolarmente, non consentono di valutare l'efficienza della disinfezione ed il comportamento/destino degli indicatori fecali, durante il processo, è molto differente da quello dei patogeni.

2. Aspetti quantitativi della disinfezione

La normativa americana Surface Water Treatment Rule (SWTR, [1]) si propone di proteggere la salute umana dalla trasmissione di agenti patogeni responsabili di malattie infettive tramite il consumo di acque superficiali sottoposte a trattamenti di potabilizzazione. L'abbattimento degli agenti patogeni si attua mediante la disinfezione, intesa come una fase di inattivazione/uccisione dei patogeni con agenti chimici disinfettanti (Cloro, Ozono ecc.) integrata da una fase di rimozione attraverso processi di filtrazione. Tale norma richiede che la disinfezione sia sempre presente, mentre può venire a mancare la barriera della filtrazione se, le acque, attraverso un continuo monitoraggio, risultano di adeguata qualità. Nel valutare l'efficacia della disinfezione la legislazione prende come riferimento non solo gli enterovirus, ma anche le cisti di Giardia. A seconda delle caratteristiche della risorsa

(a bassa, media, elevata contaminazione fecale), il processo di disinfezione deve raggiungere rendimenti di abbattimento complessivi minimi di 3 log (99.9%) per le cisti di *Giardia* e, contemporaneamente, di 4 log (99.99%) per gli enterovirus, fino ad un massimo di 5/6 log per *Giardia*/enterovirus.

La normativa fornisce quindi le metodologie per verificare se l'impianto è conforme a quanto prescritto, introducendo un livello complessivo di abbattimento (xlog) che deve essere ottenuto attraverso i trattamenti di inattivazione e di rimozione. L'accertamento dell'abbattimento tramite inattivazione è fatto attraverso il prodotto $C \cdot t$, dove C rappresenta la concentrazione del disinfettante residuo dopo il tempo di contatto (espressa in mg/l) e t il tempo di contatto (espresso in minuti), intercorso tra il punto dell'aggiunta del disinfettante e il punto dove viene misurato il disinfettante residuo. Per i disinfettanti consolidati sono disponibili, per differenti temperature e per differenti valori del pH, i valori del prodotto $C \cdot t$ necessari per ottenere (o per verificare) prefissati livelli di inattivazione delle cisti di *Giardia* e dei virus. L'accertamento dell'abbattimento tramite filtrazione è ottenuto attraverso il controllo dei dati di torbidità all'uscita dei filtri, con misure fatte ogni 4 ore/giorno per un mese intero. Se tale valore rispetta gli standard tecnologici imposti da SWTR, viene assegnato, diversificato per tecnologia di filtrazione, un credito di rimozione delle cisti di *Giardia* e dei virus.

3. Gestione del processo di disinfezione

Prescindendo dalla necessità ed importanza che i singoli stadi di trattamento siano ben progettati e condotti secondo criteri che ne garantiscono (a priori) un buon funzionamento, esiste anche l'esigenza di realizzare uno strumento gestionale capace di fornire una stima delle prestazioni del processo di disinfezione, utilizzando in modo opportuno i parametri chiave di tale processo, sia quelli monitorati in continuo, che quelli analizzati in modo discontinuo (sempre su base giornaliera).

Questo flusso di dati e la loro successiva integrazione sono in condizioni tipiche per la creazione di sistemi informatici in grado di arricchire, in modo non automatico, il flusso informativo e sottoporlo ad opportune elaborazioni, questa volta in modo automatico e con l'ausilio di opportuni algoritmi, per produrre un'informazione più complessa e utile alla valutazione d'insieme del processo.

La Figura 1 rappresenta il razionale che sta alla base di tale strumento gestionale. I vari parametri del processo di disinfezione (temperatura, tipo di disinfettante, pH, concentrazione residua, torbidità etc) nonché le condizioni di flusso delle vasche (portata, volume, etc) vengono utilizzati in modo integrato per calcolare l'efficienza del processo di inattivazione (xlog): secondo la metodologia SWTR, per quanto riguarda l'inattivazione delle cisti di *Giardia* e dei virus, e con una integrazione della procedura SWTR (il rendimento della rimozione della torbidità) per quanto riguarda la rimozione dei patogeni di riferimento.

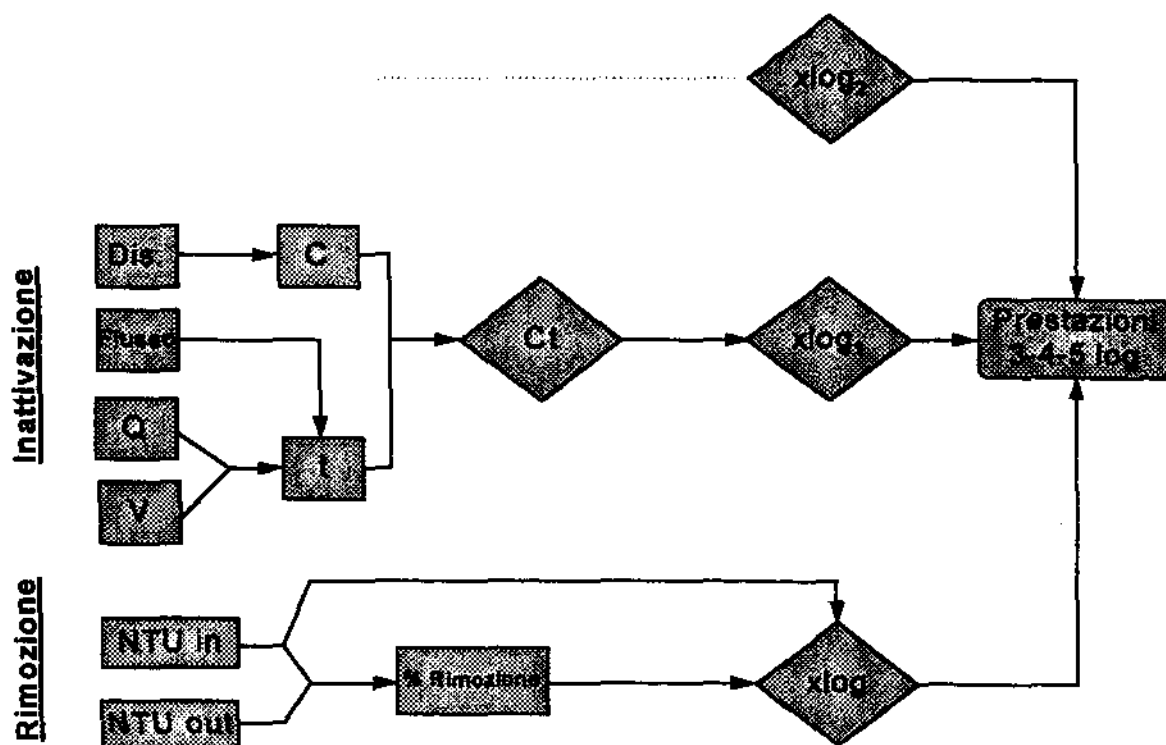


Figura 1. - Schema applicazioni della metodologia/criteri SWTR (logica del programma)

Per poter realizzare tale sistema si è reso necessario creare una serie di algoritmi che mettono in relazione l'inattivazione e la rimozione con i parametri del processo. Si è inoltre realizzato un ulteriore algoritmo che mette in relazione il rischio sanitario con il consumo dell'acqua potabile prodotta dall'impianto, in modo da poter confrontare questo dato con quello richiesto da SWTR per il tipo di risorsa potabilizzata.

3.1 Algoritmi per valutare l'efficacia dell'inattivazione

Per realizzare l'algoritmo di inattivazione si è reso necessario trasformare in funzioni continue i tabulati SWTR [2]), che mettono in relazione gli $xlog$ di inattivazione con i valori di pH, temperatura, concentrazione di disinfettante e tempo di contatto. Per il cloro si è in un certo senso percorso a ritroso il procedimento usato in SWTR, dove i dati sperimentali sono serviti per ricalcolare la relazione continua che lega i parametri di impianto con l'abbattimento costante di 3 log. Successivamente con alcuni fattori cautelativi si sono estese le relazioni a temperature maggiori di quelle del modello e si sono calcolate, considerando una cinetica del primo ordine, le condizioni di impianto che consentono $xlog$ di inattivazione maggiori e minori di

quelli di riferimento. Non essendo reperibili assunzioni e fattori di calcolo si sono presi come base i dati tabulati e si è ricostruita la funzione che calcola gli xlog per ogni valore di pH, temperatura, concentrazione e tempo di contatto.

Per i rimanenti disinfettanti chimici SWTR riporta i valori tabulati ed alcune indicazioni sulla loro valutazione, che sono state incorporate negli algoritmi di calcolo.

La relazione generale è rappresentabile dalla funzione continua:

$$xlog = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = f(T, pH, C, t)$$

dove $xlog$ = logaritmo dell'inattivazione di Giardia o virus

I = numero di organismi presenti dopo la fase disinfezione

I_0 = numero di organismi presenti prima della disinfezione

pH = pH dell'acqua, importante solo nel caso dell'azione disinfettante del cloro nei confronti delle Cisti di Giardia

T = temperatura

C = concentrazione residua del disinfettante

t = tempo di contatto.

Nelle tabelle 1 e 2 sono riassunti gli algoritmi messi a punto e le condizioni di applicazione.

3.2 Algoritmi per valutare l'efficacia della rimozione

La normativa SWTR non fornisce una relazione diretta fra la rimozione delle cisti di Giardia e dei virus, ma assegna crediti di rimozione. Essa cioè consente solamente di verificare se un impianto di filtrazione opera bene o no; nel caso operi bene gli viene assegnato un credito di rimozione tipico per ogni tecnologia di filtrazione. Il giudizio è consuntivo (dopo 1 mese) e non vi è alcun modo di valutare il processo di rimozione in continuo su base giornaliera.

Si è messo a punto un modello per valutare in continuo l'efficienza della rimozione: tale algoritmo è stato realizzato solo per la filtrazione diretta per contatto. Vari studi [3-9] indicano che la rimozione delle cisti di Giardia è ben rappresentata da due parametri: la rimozione della torbidità e la rimozione delle particelle di una certa dimensione (dell'ordine delle dimensioni delle cisti). Da questi studi emerge che il migliore parametro per valutare l'efficienza di rimozione è il conteggio delle particelle ($> 3\mu$).

La misura della torbidità presenta comunque un'accettabile correlazione con l'efficienza dell'impianto, come hanno dimostrato ulteriori dati sperimentali [9-10].

Negli impianti di potabilizzazione il parametro più comunemente misurato è la torbidità (NTU). E' attualmente molto raro trovare impianti dove si esegua il

Tabella 1. - Algoritmi e condizioni di applicazione per l'inattivazione delle cisti di Giardia.

Disinfettante chimico	Algoritmo	Condizioni di applicazione
Cloro/Ipoclorito	$x \log = \frac{C \cdot t}{0.336pH^{2.722} C^{0.183} T^{-0.152}}$	$T > 5$ $6 \leq pH \leq 9$
	$x \log = \frac{C \cdot t}{0.336pH^{2.722} C^{0.183} T^{-0.152}}$	$0.5 \leq T \leq 5$ $6 \leq pH \leq 9$
Biossido di Cloro	$x \log = \frac{C \cdot t}{9.889 - 0.244 \cdot T}$	$T > 5$ $6 \leq pH \leq 9$
	$x \log = \frac{C \cdot t}{23.333 - 2.733 \cdot T}$	$0.5 \leq T \leq 5$ $6 \leq pH \leq 9$
Ozono	$x \log = \frac{C \cdot t}{0.633 \cdot 0.933^{(T-5)}}$	$T > 5$ $6 \leq pH \leq 9$
	$x \log = \frac{C \cdot t}{0.633 \cdot 0.914^{(T-5)}}$	$0.5 \leq T \leq 5$ $6 \leq pH \leq 9$

Tabella 2. - Algoritmi e condizioni di applicazione per l'inattivazione dei virus

Disinfettante chimico	Algoritmo	Condizioni di applicazione
Cloro/Ipoclorito	$x \log = \frac{C \cdot t}{2.00 \cdot 0.933^{(T-5)}}$	$T > 5$ $6 \leq pH \leq 9$
	$x \log = \frac{C \cdot t}{2.00 \cdot 0.914^{(T-5)}}$	$0.5 \leq T \leq 5$ $6 \leq pH \leq 9$
Biossido di Cloro	$x \log = \left[\frac{C \cdot t}{0.920 \cdot 0.933^{(T-5)}} \right]^{0.388}$	$T > 5$ $6 \leq pH \leq 9$
	$x \log = \left[\frac{C \cdot t}{0.920 \cdot 0.914^{(T-5)}} \right]^{0.388}$	$0.5 \leq T \leq 5$ $6 \leq pH \leq 9$
Ozono	$x \log = \frac{C \cdot t}{0.300 \cdot 0.933^{(T-5)}}$	$T > 5$ $6 \leq pH \leq 9$
	$x \log = \frac{C \cdot t}{0.300 \cdot 0.914^{(T-5)}}$	$0.5 \leq T \leq 5$ $6 \leq pH \leq 9$

conteggio delle particelle (in Italia sono state installate solo alcune unità di tali strumentazioni, soprattutto in laboratorio). Per questo motivo si è costruito un algoritmo per correlare l'abbattimento delle cisti di Giardia e dei virus a quello della torbidità.

Per realizzare l'algoritmo si sono presi in considerazione dati di letteratura scientifica^[11-12], in particolare quelli degli impianti che applicano processi di filtrazione diretta con torbidità in ingresso non superiore a 5+7 NTU. Non essendo la documentazione molto estesa si è ricorso anche a dati relativi ad abbattimenti con i processi convenzionali. Le prestazioni dei filtri convenzionali sono state convertite in prestazioni dei filtri diretti in questo modo:

- si è considerato che la normativa SWTR, a parità d'efficacia del processo di filtrazione, assegna alla filtrazione convenzionale un credito di rimozione delle cisti di *Giardia* più alto di 0.5 log;

- se gli studi di letteratura riportano la relazione fra l'abbattimento delle cisti e la rimozione della torbidità nella fase di sedimentazione, i due impianti sono assimilati eliminando dall'impianto di filtrazione convenzionale la parte di rimozione delle cisti ottenuta dalla sedimentazione stessa. La rimozione stimata per la filtrazione diretta è in genere 0.5+0.7 log inferiore a quella del sistema convenzionale.

L'algoritmo è stato realizzato considerando che le cisti rimosse fossero direttamente proporzionali alle cisti inizialmente presenti, alla torbidità iniziale (prima della fase di filtrazione) e finale (dopo la fase di filtrazione), attraverso un modello moltiplicativo del tipo:

$$I = KJ_0^\alpha T_i^\beta T_u^\gamma \quad (1)$$

dove I = numero di organismi presenti

I_0 = numero di organismi iniziali (prima della fase di filtrazione)

T_i = torbidità iniziale (prima della fase di filtrazione)

T_u = torbidità finale (dopo la fase di filtrazione)

K, α, β, γ = costanti da determinare

Se si considera $\alpha = 1$ (cioè le cisti presenti dopo la filtrazione sono dipendenti in modo lineare con quelle iniziali) la relazione diventa:

$$I = KJ_0 T_i^\beta T_u^\gamma \quad (2)$$

l'equazione 2 può essere così trasformata:

$$\frac{I}{I_0} = K T_i^{\beta+\gamma} \left(\frac{T_u}{T_i}\right)^\gamma$$

applicando i logaritmi si ottiene:

$$\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) = \log_{10}(K) + \delta \log_{10}(T_i) + \gamma \log_{10} \left(\frac{T_u}{T_i} \right) \quad (3)$$

L'equazione (3) rappresenta proprio la relazione cercata, in quanto esprime il legame che intercorre fra la rimozione delle cisti di *Giardia* e la torbidità. Essa è risolvibile con una regressione lineare multipla, dove K, α, β, γ , sono i parametri da stimare.

Utilizzando i dati reperiti in letteratura si ottiene:

$$\left\{ \begin{array}{l} \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = 0.433 - 0.644 \log(T_1) + 1680 \log\left(\frac{T_1}{T_u}\right) \\ 0.4 \text{ NTU} \leq T_1 \leq 7 \text{ NTU} \\ R_T \geq 50\% \end{array} \right.$$

I limiti di applicazione dell'algoritmo derivano dai dati utilizzati, in quanto il range di torbidità in ingresso del filtro dei dati di letteratura varia fra 0.4 e 7 NTU e la rimozione di torbidità è sempre maggiore del 50%. Tale algoritmo permette di stimare in modo diretto e continuo il valore della rimozione delle cisti di Giardia nel caso di filtrazione diretta, conoscendo i livelli di torbidità prima e dopo il filtro. Per uniformarsi ai criteri prudenziali che hanno ispirato SWTR, si accetta che il massimo rendimento di abbattimento di cisti di Giardia non sia più di 0.5 log superiore al valore accreditato da SWTR.

La relazione è stata sperimentata su dati indipendenti provenienti da uno studio effettuato su impianti di filtrazione diretta [13]. I valori forniti dall'algoritmo sovrastimano di circa 0.5 log i dati dello studio.

Per una più efficace applicazione dello strumento gestionale sarebbe importante poter calibrare l'algoritmo con i dati reali dell'impianto in studio (rimozione torbidità / rimozione cisti di Giardia).

La torbidità è un buon indicatore della rimozione delle cisti di Giardia quando i valori sono elevati (maggiori di 5 NTU) [13]. Quando i valori di torbidità sono bassi sono soprattutto le particelle più fini a contribuire alla misura. Pertanto sarebbe auspicabile sviluppare un algoritmo basato sulla relazione fra rimozione delle cisti di Giardia e rimozione delle particelle di diametro $> 3 \mu\text{m}$.

Per valutare l'efficienza di rimozione dei virus, non avendo reperito dati nella letteratura internazionale, ci si è affidati a quanto indicato dalla normativa SWTR per la filtrazione diretta. La relazione utilizzata è quindi la stessa della rimozione della Giardia, considerando però che i virus vengono rimossi con un'efficienza minore per via delle dimensioni.

Nella Tabella 3 sono riassunti gli algoritmi messi a punto e le condizioni di applicazione.

Tabella 3: - *Algoritmo e condizione di applicazione per la valutazione della rimozione di cisti di Giardia e virus. LEGENDA: T_i = Torbidità in ingresso dei filtri; R_T = Rimozione della torbidità (in percentuale)*

Tipo di Indicatore	Algoritmo	Condizione di applicazione
Cisti di Giardia	$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = 0.433 - 0.644\log(T_i) + 1680\log\left(\frac{T_i}{T_U}\right)$	$0.4 \leq T_i \leq 7$ $R_T \geq 50\%$
Virus	$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = -0.567 - 0.644\log(T_i) + 1680\log\left(\frac{T_i}{T_U}\right)$	$0.4 \leq T_i \leq 7$ $R_T \geq 50\%$

3.3 Modello di rischio per le cisti di Giardia

Nel realizzare il modello di rischio connesso all'ingestione di cisti di Giardia con l'acqua (curva dose-risposta), si è fatto riferimento al lavoro di Regli et al. [14]. Tale lavoro assume che la distribuzione dei microrganismi nella dose sia del tipo Poissoniano. Sotto questa condizione, con le ulteriori ipotesi che un solo microrganismo è in grado di causare una infezione e che l'interazione tra microrganismi e ospite è costante, la probabilità di infezione è data da un modello di tipo esponenziale:

$$P_i = 1 - e^{(-r\mu V)} \quad (4)$$

dove V = volume di liquido contenente la concentrazione media μ di organismi

μ = concentrazione media di organismi

r = frazione di organismi ingeriti che sopravvive alla iniziale infezione

μV è il numero di organismi presenti nel volume considerato.

Generalmente si nota come i pochi dati sperimentali disponibili mostrino un andamento più graduale rispetto a quello descritto dall'equazione 4. Ciò può essere spiegato dal fatto che in realtà r non è in genere costante (come ipotizzato) ma varia secondo una distribuzione, solitamente di tipo beta. Per questa ragione si utilizza la distribuzione beta-Poisson:

$$P_i = 1 - \left(1 + \frac{\mu V}{\beta}\right)^{-\alpha} \quad (5)$$

i parametri α, β caratterizzano la curva dose-risposta.

Se α aumenta il modello beta-Poissoniano tende a diventare esponenziale.

La valutazione dei parametri della curva dose-risposta viene fatta applicando il metodo della massima verosimiglianza ai dati disponibili. Nella tabella 4 vengono riportati ed analizzati i risultati degli studi fatti su cisti di Giardia e virus.

Tabella 4. - La miglior curva dose-risposta di vari studi ^[14]

Tipo di organismi	Modello migliore	Parametri del modello
Giardia lamblia	Esponenziale	$r = 0.02$
Echoirus 12	Beta-Poisson	$\alpha = 0.374$ $\beta = 186.69$
Rotavirus	Beta-Poisson	$\alpha = 0.26$ $\beta = 0.42$
Endamoeba coli	Beta-Poisson	$\alpha = 0.128$ $\beta = 0.581$
Poliovirus I	Esponenziale	$r = 0.009102$
Poliovirus II	Beta-Poisson	$\alpha = 0.1097$ $\beta = 1524$
Poliovirus III	Beta-Poisson	$\alpha = 0.409$ $\beta = 0.788$

Gli Autori assumono che il giorno costituisca la base temporale unitaria per la misura del rischio, che ogni giornata sia così un evento indipendente e con la medesima distribuzione dei patogeni. Quindi il rischio annuale non è altro che la somma dei rischi giornalieri come sotto riportato:

$$P_a = 1 - (1 - P_d)^n \quad (6)$$

dove P_a = rischio annuale

P_d = rischio giornaliero.

n = numero di giornate considerate (365 nel caso di un anno)

Utilizzando tale modello SWTR ha stabilito quale deve essere la densità geometrica media di cisti di Giardia nell'acqua destinata al consumo umano, confrontabile con un rischio di infezione su base annuale di $1 \cdot 10^{-4}$. Se si ipotizza che il volume di acqua ingerita sia di 2 l/d allora il rischio giornaliero diviene:

$$P_d = 1 - (1 - P_a)^{\frac{1}{365}} = 2.739 \cdot 10^{-07}$$

dalla 6 si può ricavare:

$$\mu = -\frac{\log(1 - P_d)}{rV} \cong 7 \cdot 10^{-06} / L$$

Di conseguenza a seconda che la concentrazione media geometrica nella risorsa grezza sia rispettivamente $7/10^3L$, $7/10^2L$ o $7/10L$, l'obiettivo del sistema deve essere 3, 4 o 5 log di inattivazione/rimozione. L'utilizzo della concentrazione media geometrica al posto della concentrazione media è ritenuto ragionevole in quanto è vero che la media geometrica fornisce un valore meno conservativo, ma il modello considera che tutte le cisti di Giardia presenti nell'acqua disinfettata siano vive ed

infettanti. E' noto che non tutte le cisti di Giardia sono vive e l'ipotesi che la distribuzione delle stesse sia costante nell'arco delle varie giornate non è verificata.

Nel programma di gestione si è utilizzato tale modello per confrontare il rischio atteso (SWTR) con quello che realmente si riscontra nell'impianto in una data giornata o nell'arco di un periodo predeterminato. Si sono sommati da un lato i rischi attesi giornalieri connessi ad un corretto funzionamento dell'impianto e dall'altro i rischi previsti considerando l'abbattimento effettivo giornaliero, dato dalla somma degli abbattimenti totali orari diviso per il numero di ore di funzionamento dell'impianto. Il confronto fra questi due valori fornisce sinteticamente un giudizio del funzionamento dell'impianto.

Non essendo solitamente disponibili dati sulla concentrazione delle cisti di Giardia nell'acqua grezza, il modello assume che predefiniti livelli di abbattimento vengano imposti dalle caratteristiche generali della risorsa grezza (desunti dagli indicatori fecali, presenza di scarichi diretti di origine civile/agricola etc). Pertanto, se all'impianto è richiesto un abbattimento totale di 3, 4 o 5 log, la concentrazione media è stimata rispettivamente in $7 \cdot 10^{-3}/L$, $7 \cdot 10^{-2}/L$ o $0.7/L$.

L'informazione aggiuntiva desunta da tale algoritmo va pertanto valutata in modo non emotivo e soprattutto come indicatore sintetico e immediato di prestazione dell'impianto. Maggiore significato sanitario (rischi di infezione nell'arco di un anno) potrà essere associato a tale parametro nel caso siano conosciuti le reali densità di tali patogeni nell'acqua grezza.

3.4 Descrizione del sistema implementato

Nei paragrafi precedenti è stata descritta la metodologia da applicare nella gestione di un impianto di disinfezione. Tale metodologia è implementata in un programma (G.P.D. gestione del processo di disinfezione) che permette un'analisi giornaliera dei dati. Come riportato nella figura 1 si è cercato di realizzare uno strumento che, utilizzando gli algoritmi descritti, calcoli e visualizzi l'efficienza di un impianto complessivamente e nei singoli stadi nei quali può essere suddiviso il trattamento.

Il programma è stato realizzato su PC sfruttando il pacchetto software VISUAL BASIC versione 3.0 prodotto dalla Microsoft Corporation^[15-17]. Tale programma funziona su un PC 80286 o superiore con almeno 2 Mb di RAM, con MS-DOS o PC-DOS versione 3.1 o superiori e con versioni di WINDOWS 3.0 o superiori. Lo strumento è stato ideato in modo da poter essere applicato, nel limite del possibile, ad impianti con differenti configurazioni. In una prima fase si sono definiti i possibili stadi di un processo di disinfezione. I quattro principali stadi individuati sono: predisinfezione, filtrazione, postdisinfezione e disinfezione in rete. Questi possono essere presenti singolarmente od in modo variamente combinato. Sono stati creati database dedicati per ogni stadio. Tale scelta è sembrata la più efficiente considerando la mole di dati che si deve in genere gestire.

Il programma, una volta caricati i dati raccolti giornalmente o in un certo periodo, consente una valutazione immediata dell'efficacia del processo mediante l'uso degli algoritmi precedentemente descritti per:

- a) mettere in relazione la rimozione di torbidità con la rimozione di cisti di *Giardia* e virus;
- b) calcolare l'inattivazione ottenibile con i disinfettanti più comunemente usati (cloro/ipoclorito, biossido di cloro ozono);
- c) confrontare l'efficacia conseguibile con gli obiettivi minimi da raggiungere;
- d) effettuare periodicamente valutazioni statistiche d'insieme sulle prestazioni del processo;
- e) vincolare le prestazioni in funzione di nuove condizioni di trattamento prescelte (fase di simulazione).

4. Applicazione del supporto informatico ad un caso reale

Per l'applicazione della metodologia proposta sono stati utilizzati i dati disponibili presso un Acquedotto del nord Italia. L'impianto di potabilizzazione oggetto dell'analisi si alimenta da un lago eutrofico che riceve scarichi civili ed industriali. I parametri analitici considerati per caratterizzare le acque da trattare e per definire la tipologia di trattamento richiesta sono: T, pH, torbidità, ammoniaca, coliformi fecali, coliformi totali e la carica batterica totale a 22°C. Nella tabella 5 si riportano in sintesi i valori dei parametri sopra indicati, relativi all'anno 1992.

In base alla classificazione del DPR 515/83 la risorsa idrica utilizzata risulta di categoria A3.

Tabella 5. - *Caratteristica dell'acqua grezza all'opera di presa nell'anno 1992*

PARAMETRI	N° analisi	Minimo	Massimo	Media	Mediana
Temperatura (°C)	8	7	9	8	8
pH	31	7.43	8.14	7.77	7.81
Torbidità	8	0.45	1	0.65	0.58
NH ₃ (µg/L)	28	0	387	100	58
CF (UFC/100 mL)	35	10	13100	1299	400
CT (UFC/100 mL)	35	500	34200	7400	4100
CBT 22°C (UFC/1mL)	35	20	5350	807	100

Le acque di categoria A3 sono le più soggette ad inquinamento, sia di origine civile/industriale che agricolo; per esse è richiesto un maggior numero di barriere di

trattamento. Si può quindi fare un analogia a quanto indicato dall'OMS nelle recenti Linee guida (1994)[18] e dallo stesso SWTR ed ipotizzare che una risorsa di tipo A1 possa richiedere 3 log di abbattimento (rimozione + inattivazione) di cisti di Giardia e contestualmente 4 log di abbattimento (rimozione + inattivazione) dei virus. Conseguentemente le risorse di tipo A2 e A3 possono richiedere un trattamento di 4 e 5 log di rimozione/inattivazione di cisti di Giardia, 5 e 6 log di rimozione/inattivazione di Virus.

La risorsa analizzata essendo non protetta e con evidente contaminazione fecale richiede almeno quattro stadi di trattamento. Secondo SWTR si può ipotizzare che tali acque contengano una densità iniziale di cisti di Giardia tali da rendere necessario un abbattimento complessivo di 5 log di cisti di Giardia e 6 log di virus.

L'impianto di potabilizzazione è costituito da una linea di trattamento (potenzialità di 400 m³/h), che ha la configurazione rappresentata nella figura 2.

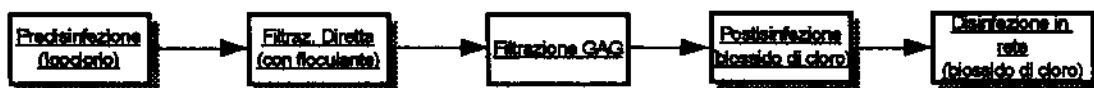


Figura 2. - *Barriere di trattamento dell'impianto analizzato (gli stadi che funzionano da potenziali barriere sono ombreggiati)*

Per i vari stadi dell'impianto era disponibile la seguente documentazione:

- a) predeinfezione: valori registrati automaticamente di concentrazione di cloro libero e portata misurati dopo la vasca di predeinfezione. Il valore di pH e di temperatura è fornito come dato medio mensile;
- b) filtrazione: dati puntuali giornalieri della torbidità in ingresso e in uscita dei filtri;
- c) postdeinfezione: valori registrati automaticamente di biossido di cloro, portata e pH misurati dopo la vasca di postdeinfezione. Il valore di temperatura è considerato identico a quello delle fase di predeinfezione.
- d) disinfezione in rete: valori di biossido di cloro e pH registrati automaticamente in uscita della vasca di postdeinfezione. Il valore di temperatura è considerato identico a quello delle fase di predeinfezione.

Il programma di caricamento prevede che tutti i dati siano mediati sull'ora.

Per quanto riguarda la misura del tempo di contatto nelle varie vasche, in mancanza di misure realizzate con la tecnica dei traccianti si è adottato un parametro correttivo al tempo teorico di contatto (volume delle vasche diviso la portata media oraria transitata). Tale parametro è stimato in base alle caratteristiche di flusso delle varie vasche. I valori del tempo di contatto e del volume delle vasche sono riportati nella Tabella 6.

Tabella 6. - Parametri utilizzati per valutare le prestazioni del processo di trattamento.

Caratteristiche	Predisinfezione	Postdisinfezione	Disinfezione in rete
Volume	460 m ³	484 m ³	20 m ³
Tempo di contatto	0.4 V/Q	0.30 V/Q	V/Q

I dati relativi ai primi tre mesi dell'anno 1993 sono stati inseriti nel programma e si è quindi analizzato il comportamento dell'impianto. Nelle figure 3-7 sono riportati gli andamenti della rimozione/inattivazione di virus e cisti di *Giardia* in una giornata tipo e le statistiche relative all'intero periodo considerato.

Valutando tutte le elaborazioni fornite dal programma si possono trarre le seguenti considerazioni sulle prestazioni dell'impianto:

- Le prestazioni totali raggiunte dall'impianto sono lontane da quelle richieste (SWTR) per la rimozione/inattivazione delle cisti di *Giardia*. Come si può rilevare nelle figure 4 e 5 il rendimento di abbattimento di cisti di *Giardia* e virus nello stadio di filtrazione è costante, in quanto disponendo di un'unica serie di misure di torbidità si sono assegnati valori costanti di torbidità in ingresso ed in uscita nelle varie ore della giornata. Soltanto in alcune giornate si raggiunge saltuariamente l'obiettivo dei 5 log di rimozione/inattivazione: la figura 6 evidenzia come siano solo il 18% delle ore analizzate (369 su 2080). Tutt'altra situazione per quanto riguarda i virus (Figura 3) dove l'obiettivo di rimozione/inattivazione è ampiamente raggiunto.

- Il range di funzionamento dell'impianto nelle ore in cui non si raggiungono i 5 log di rimozione/inattivazione delle cisti di *Giardia* varia fra i 3.5 e 4 log con frequenze medie del 80÷85%. Questo significa che, nell'ambito dei tre mesi considerati, l'impianto ha uno standard di funzionamento di 4 log in tutte le 24 ore della giornata.

- Dall'analisi giornaliera dei dati (Figura 4) si evidenzia come la rimozione delle cisti di *Giardia* sia quasi esclusivamente fornita dagli stadi di predisinfezione e di filtrazione. Gli altri due stadi forniscono solo contributi irrilevanti.

- Benché la torbidità dell'acqua trattata sia ampiamente nei limiti di legge, il processo di filtrazione non raggiunge sempre le prestazioni di rimozione delle cisti di *Giardia* accreditate da SWTR (2÷2.5 log): mediamente i rendimenti ottenuti sono tra 1.0 e 2.0 log.

L'analisi effettuata consente possibili suggerimenti per ottimizzare il processo di rimozione e di inattivazione. E cioè:

- Migliorare l'attuale processo di filtrazione diretta in modo da ottenere livelli di torbidità in uscita costantemente inferiori a 0.1 NTU. Ciò può consentire rimozioni delle cisti di *Giardia* maggiori del 99% (2 log) e conseguente riduzione del *C·t* complessivo applicato per il processo di inattivazione con disinfettante chimico.

- Migliorare la fase di predisinfezione (geometria della vasca) e rendere più efficiente lo stadio di postdisinfezione, in modo da distribuire l'inattivazione ad almeno due livelli.

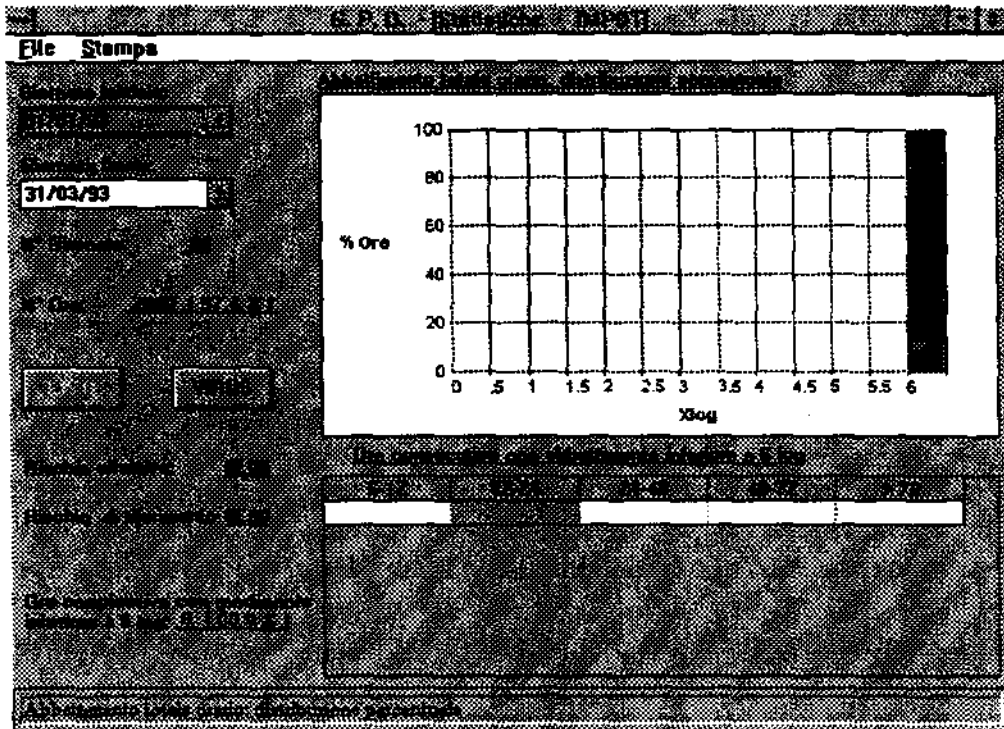


Figura 3. - Distribuzione della rimozione/inattivazione dei virus nei tre mesi di analisi

5. Conclusioni

Si è voluto verificare la possibilità di applicare alcuni criteri innovativi contenuti in SWTR alla gestione quantitativa del processo di disinfezione. L'obiettivo è ottenere rendimenti di abbattimento (xlog) che, in funzione delle densità iniziali dei patogeni di riferimento, consentano un rischio di infezione teorico di 1 persona su 10.000 all'anno (10^{-4}). Tuttavia in prima approssimazione, viste le difficoltà tecniche, per valutare le prestazioni del processo di disinfezione non è necessario misurare la concentrazione iniziale dei patogeni, mentre quelle presenti a valle delle varie fasi del processo vengono valutate indirettamente. Sono la densità degli indicatori fecali e le caratteristiche della risorsa ad indicare la "presunta" densità dei patogeni e quindi il livello di abbattimento richiesto; mentre sono i valori assunti da alcuni importanti parametri di processo (quali tempo di contatto, disinfettante residuo, torbidità, etc.) a

documentare l'efficacia del trattamento. Lo strumento realizzato si è rivelato applicabile alla pratica acquedottistica; è un valido supporto tecnico in quanto riesce a definire in modo quantitativo, e pertanto misurabile, l'efficacia del processo. Il modello che descrive il processo di disinfezione può essere utilizzato nella tecnica di simulazione; è infatti possibile far variare i parametri del processo (quali ad esempio

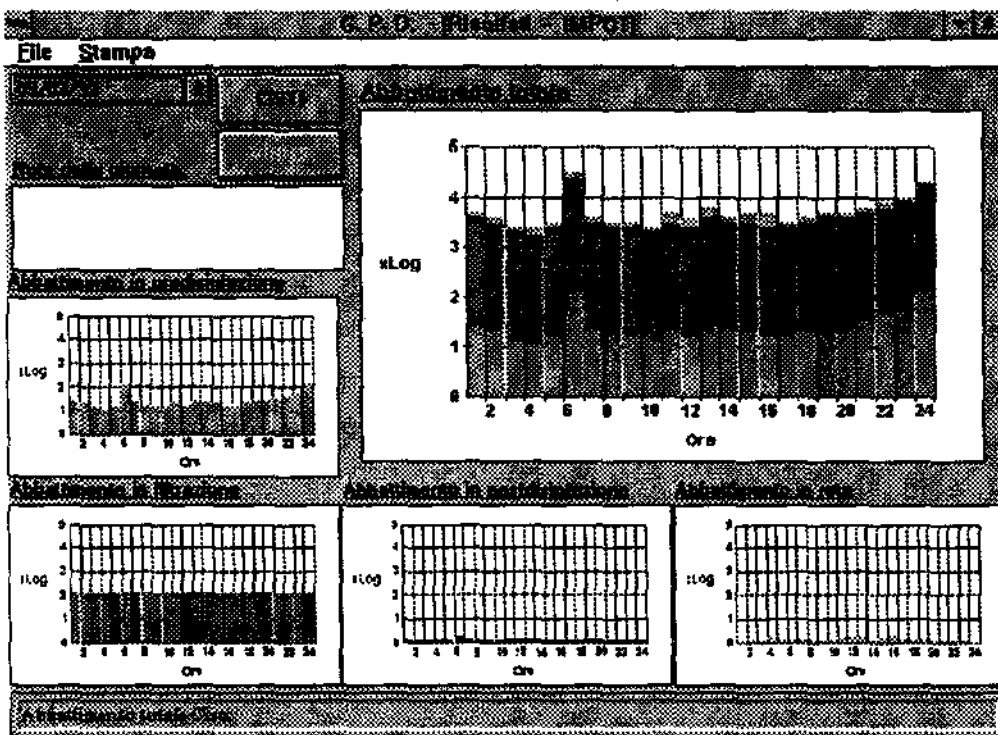


Figura 4. - Andamento della rimozione/inattivazione delle cisti di Giardia in una giornata tipo

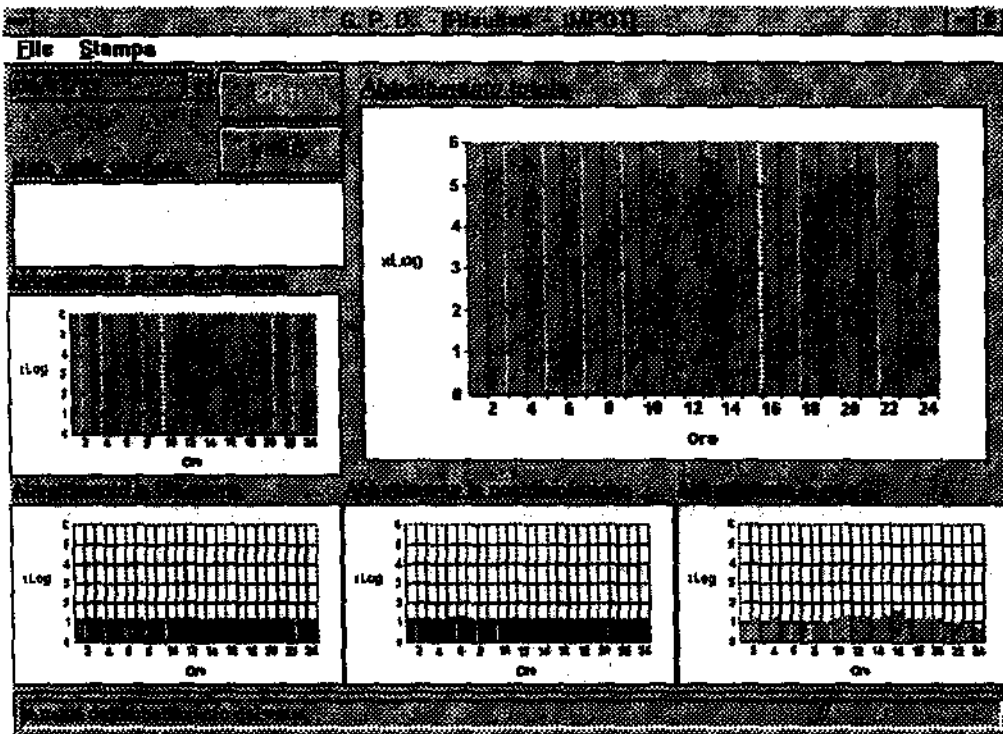


Figura 5. - Andamento della rimozione/inattivazione dei virus in una giornata tipo

Il calcolo del rischio sanitario associato alla prestazione dell'impianto, non è da impiegare per la previsione di possibili episodi di infezione, derivanti dalla non conformità ai livelli raccomandati di trattamento. Deve essere piuttosto visto come un valido aiuto ai responsabili dell'impianto nell'applicazione di appropriate tecnologie.

Nell'utilizzare in buona parte i criteri e il rationale contenuti in SWTR, si è voluto passare da uno strumento di analisi standardizzato e di tipo dicotomico (cioè, l'impianto è o non è conforme nel periodo di controllo a quanto prescritto dalla legge SWTR) ad uno strumento di valutazione continua (giornaliera) della "reale" efficienza del trattamento attuato e quindi del processo. Questa operazione potrebbe aver portato ad una sottostima della effettiva efficacia del processo di rimozione/inattivazione. Infatti in SWTR le assunzioni e le incertezze nella stima di certi parametri sono tutti orientati verso posizioni conservative. Questo atteggiamento è giustificato nell'eventualità di controlli sistematici di tipo puntuale, mentre potrebbe risultare eccessivamente cautelativo quando la frequenza del controllo è continua o su base oraria.

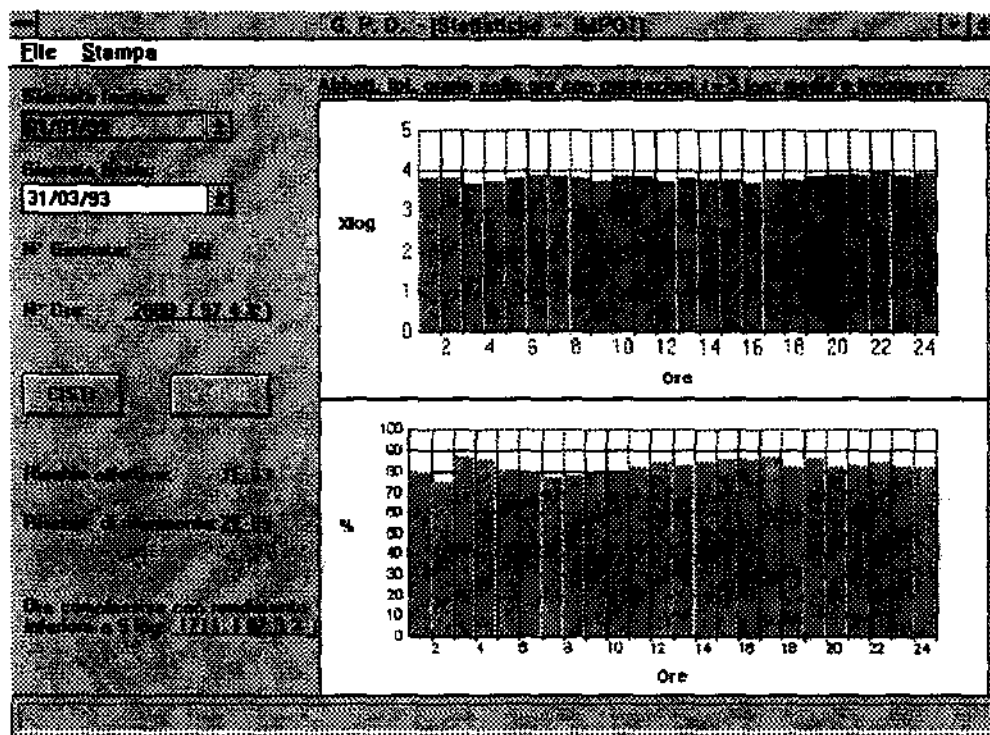
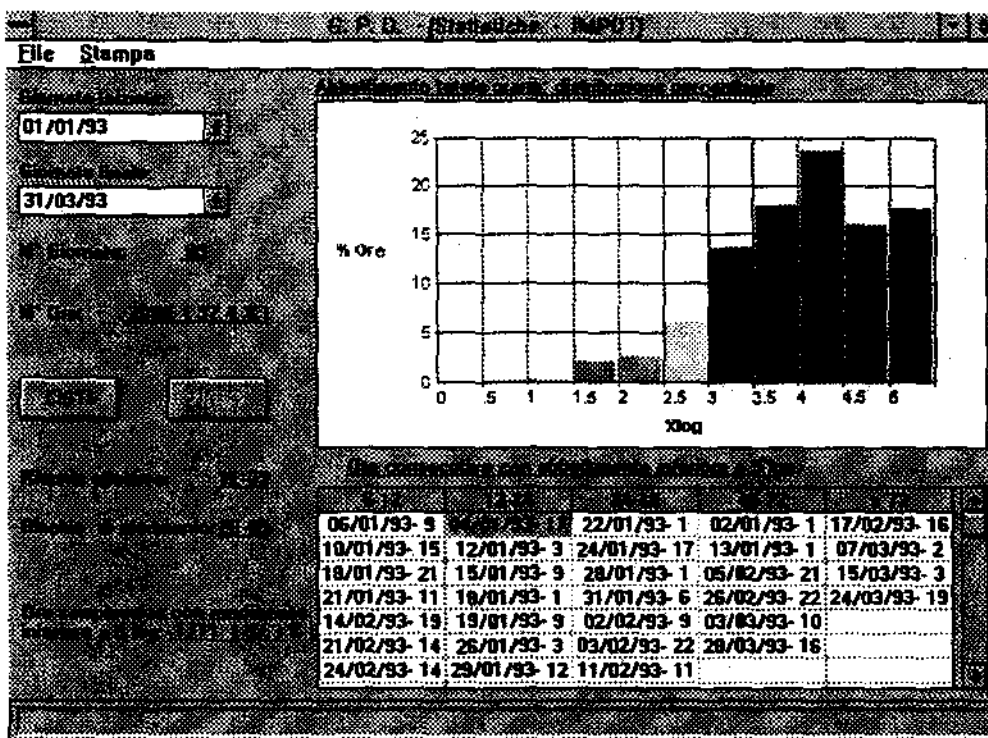


Figure 6-7. - Distribuzione delle rimozione/inattivazione delle cisti di Giardia nei tre mesi di analisi, frequenza e valore medio dei dati di rimozione con valore inferiori ai 5 log.

I parametri più critici risultano pertanto essere proprio quelli correlati all'efficacia dei singoli stadi di inattivazione ($C \cdot t$) ed allo stadio di filtrazione/rimozione (torbidità).

Dal momento che i rendimenti di inattivazione di virus e cisti di *Giardia* sono calcolati in condizione batch (condizioni statiche e mezzo omogeneo), la loro estrapolazione all'impianto (condizioni dinamiche e disomogeneità) pone il problema di calcolare il tempo reale di residenza e quindi il contatto fra disinfettante ed agenti patogeni. Si comprende come le modalità di misurazione del tempo di contatto possano fortemente condizionare l'effettivo calcolo della dose disinfettante ($C \cdot t$). Pertanto se, come previsto da SWTR, $C \cdot t$ deve essere calcolato una sola volta al giorno (nelle condizioni di massima portata) sembra ragionevole stimare in modo robusto e con margine di sicurezza tale parametro. Se, come nel caso dello strumento gestionale prodotto, tale calcolo viene fatto in continuo, già l'incremento di frequenza della misura giustificherebbe un minor grado di cautela; di qui la necessità di sviluppare una procedura di calcolo del tempo di contatto con tecniche ed algoritmi più complessi di quelli inseriti di default nel programma.

La torbidità è un buon indicatore della rimozione delle cisti di *Giardia* se la torbidità in ingresso ai filtri è maggiore di 5 NTU. Per valori inferiori sono soprattutto le particelle più fini (con dimensioni inferiori alle cisti di *Giardia*) a contribuire alla lettura strumentale. Sembra ragionevole quindi, come previsto da SWTR, utilizzare valori soglia di torbidità da non superare nel 95% delle misure effettuate in un mese, in quanto il raggiungimento di tale obiettivo significa una costanza di rendimento del processo di filtrazione. La misura della torbidità in continuo, è finalizzata non tanto ad apprezzare meglio la frequenza di superamento del valore soglia, quanto a fungere da parametro surrogato della densità delle cisti di *Giardia*. Se questo è lo scopo, sarebbe consigliabile correlare per ogni impianto la rimozione delle cisti alla rimozione della torbidità o meglio alla rimozione delle particelle con dimensioni $> 3 \mu\text{m}$. In questo caso potranno anche essere attribuiti rendimenti di abbattimento maggiori di quelli accreditati nella attuale versione del programma (max 2.5 log).

In conclusione, nonostante si possano discutere le scelte metodologiche ed i criteri adottati, va riconosciuto a tale strumento il grande merito intrinseco di risultare di semplice applicazione e di grande efficacia nella gestione nonché nella ottimizzazione del processo di disinfezione. Le informazioni e le valutazioni complessive ottenute da GPD si devono integrare con le verifiche del processo e le procedure di manutenzione dell'impianto.

Bibliografia

1. USEPA 1989. *National Primary Drinking Water Regulations. Filtration, Disinfection; Turbidity, Giardia lamblia, Viruses, Legionella and Heterotrophic Bacteria; Final Rule, 40 CFF parts 142 and 142*. Federal Register June 29, 1989. Washington, D.C: Govt Printing Office.
2. USEPA 1989. *Guidance manual for compliance with the Filtration and Disinfection Requirements for Public Water System Using Surface Water Sources (SWTR)*. Washington, D.C: Govt Printing Office.
3. K. R. Gertig, G. L. Williamson-Jones and B. D. Alexander 1986. *Giardia Lamblia Cyst Removal by In-line Direct Filtration*. 1986 AWWA Ann. Conf., June 22-26.
4. R. R. Mosher and D. W. Hendricks 1986. *Rapid-Rate Filtration of Low-Turbidity Water Using Field-Scale Pilot Filters to Remove Giardia Cysts and Other Substances*. Journal AWWA, 78:12:42.
5. G. S. Logsdon 1987. *Evaluating Treatment Plants for Particulate Contaminant Removal*. Journal AWWA 79:9:82.
6. M. W. LeChevallier and W. D. Norton 1992. *Examining Relationships Between Particle Counts and Giardia, Cryptosporidium and Turbidity*. Journal AWWA 82:12:54.
7. M. W. LeChevallier and W. D. Norton 1994. *Impact of the Enhanced Surface Water Treatment Rule on Water Utility Operations*. Proceeding AWWA Wat. Qual. Tec. Conf., Maimi.
8. P. J. Consonery and D. N. Greenfield 1992. *Filter Plant Peformance Evaluations: a Summary of Procedure & Results*. Pennsylvania Safe Drinking Water Program.
9. M. W. LeChevallier, W. D. Norton, R. G. Lee and J. B. Rose 1991. *Giardia and Cryptosporidium in Water Supplies*. American Water Works Association Research Foundation 1991, Denver.
10. E.C. Nieminski and J.E. Onghert (1995) *Removing Giardia and Cryptosporidium by conventional and direct filtration*. Journal AWWA 83:9:96-106.
11. G. S. Logsdon, V. C. Thurman, E. S. Frindt and J. G. Stoecker 1985. *Evaluating Sedimentation and Various Filter Media for Removal of Giardia Cysts*. Journal AWWA 77:2:61.
12. M. Y. Al-Ani, D. W. Hendricks, G. S. Logsdon and C. P. Hibler 1986. *Removing Giardia Cysts From Low Turbidity Waters by Rapid Rate Filtration*. Journal AWWA 78:4:66.
13. W. D. Bellamy, J. L. Cleasby, G. S. Logsdon and M. J. Allen 1993. *Assessing Treatment Plant Performance*. Journal AWWA 85:12:34.
14. S. Regli, J. B. Rose, C. N. Haas, C. P. Gerba 1991. *Modeling the Risk from Giardia and Viruses in Drinking Water. Research and Technology*. Journal AWWA 83:11:76.
15. Que Development Group 1994. *Programmazione in Visual Basic 3*. Jackson Libri, Milano.
16. G. Carta 1994. *Visual Basic 3: Esempi di Programmazione*. Jackson Libri. Milano.
17. A.V. 1993. *Visual Basic: Programming System for Windows*. Microsoft Corporation 1993
18. WHO 1993. *Guidelines for Drinking Water Quality. Second Edition. Volume 1 Recommendations*, Geneva.

SOPRAVVIVENZA E RICRESCITA BATTERICA IN RETE: BIOFILM E BIOCORROSIONE

Francesca Anna Aulicino

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Problematiche generali

Le acque potabili trattate per essere destinate al consumo umano sono caratterizzate da basse quantità di microrganismi. Una volta operata la distribuzione si possono verificare situazioni per cui il prodotto che arriva all'utenza mostra titoli microbici molto più elevati di quelli riscontrati all'ingresso della distribuzione. Ciò indica il generarsi, nell'ambito della distribuzione, di situazioni tali da determinare incrementi batterici.

I motivi per cui si verificano i fenomeni di incrementi batterici non sono stati ancora completamente chiariti. Escludendo, ovviamente, gli episodi di contaminazione accidentale dell'acqua, a seguito di rottura di tubazioni, ecc., che sono un'indubbia causa di nuovi apporti microbici in rete, è molto probabile che entrino in gioco meccanismi diversi e convergenti. Tali meccanismi, sono riconducibili essenzialmente a due fenomeni, quello della sopravvivenza microbica e quello dell'aggregazione e adsorbimento a superfici solide.

Le reti idriche sono ambienti ostili per la flora microbica presente a causa della carenza di nutrienti e della presenza di sostanze tossiche come i biocidi. Microrganismi come batteri, lieviti e funghi sono in grado di attuare una serie di azioni che promuovono con successo la loro sopravvivenza in questi ambienti. Le azioni più comuni sono: la riduzione delle dimensioni fisiche e delle attività metaboliche, le modifiche della struttura della membrana cellulare, i fenomeni di aggregazione e di adesione ad altre cellule e/o a materiale particolato presente nell'acqua circolante, nonché fenomeni di aggregazione e di adesione alle superfici delle tubature.

Vibrio cholerae, in ambienti poveri di nutrienti come le acque potabili, si trasforma assumendo la forma coccoide e subisce un decremento dell'85% in volume [1]. E' stato dimostrato che concentrazioni subletali di cloro e rame inducono lesioni cellulari multiple e sembra che sia la membrana citoplasmatica il target delle sostanze tossiche. Le fimbrie batteriche possono risultare danneggiate dopo esposizione al cloro, che sembra in grado di alterare le strutture superficiali batteriche che danno alle cellule le proprietà di invasività. Coliformi danneggiati mostrano riduzione dell'ATP intracellulare, della respirazione aerobica, del trasporto e dell'utilizzazione del glucosio e accumulo di lattato, etanolo ed acetato, oltre ad alterazioni legate all'attività della membrana citoplasmatica [2].

Cambiamenti nella composizione del materiale capsulare batterico producono un'augmentata resistenza ai biocidi. E' stato verificato per *Klebsiella pneumoniae* una più

elevata viscosità del materiale capsulare in situazioni poco consone al suo sviluppo. Il cambiamento nella composizione della capsula ha, come conseguenza, l'isolamento delle cellule batteriche dall'ambiente esterno ostile e ciò aumenta notevolmente la possibilità di sopravvivenza.

La presenza di biocidi induce effetti letali sulle cellule batteriche esposte, ma le percentuali maggiori di cellule subiscono danni reversibili. I batteri patogeni, ad esempio, vanno incontro, in queste condizioni, ad alterazioni che consistono in perdita o riduzione del potere patogeno, che possono, però, riacquistare quando non sono più a contatto con il biocida. Studi di laboratorio condotti su batteri enterici esposti a dosi subletali di cloro (0,25-1,6 mg/L) e rame (0,6-1 mg/L) hanno mostrato che l'effetto di questi agenti determina situazioni come quelle sopra descritte [3]. Questi dati ed i risultati riportati da altri autori suggeriscono che batteri patogeni possono sopravvivere a condizioni di vita anomale determinate da presenza di biocidi, da basse temperature, da ambienti poveri di nutrienti, ecc., che sono invece efficaci nei confronti dei coliformi. McFeters nel 1974 già riportava l'osservazione di maggiore resistenza nell'ambiente idrico degli enteropatogeni rispetto ai coliformi [4].

Batteri come *Vibrio cholerae*, *Shigella spp* e *Campylobacter jejuni*, esposti a condizioni non idonee al loro sviluppo, non riescono a crescere su terreni di coltura utilizzati per il loro isolamento. In questi casi acquistano la denominazione di "vitali ma non coltivabili". Batteri di questi gruppi, quando si trovano in queste condizioni, non crescendo sui normali terreni di coltura, non sono rilevabili costituendo, così, un rischio per la salute pubblica. Per un controllo efficiente della qualità delle acque potabili c'è necessità di capire bene questi fenomeni e risulta altrettanto importante migliorare le metodologie per l'enumerazione di microrganismi danneggiati specialmente quando essi hanno la funzione di indicatori di patogeni e quando si tratta di patogeni.

In conseguenza di comportamenti come quelli descritti i microrganismi riescono, non solo a sopravvivere, ma a moltiplicarsi nelle tubature inducendo la formazione di pellicole biologiche costituite da cellule di specie diverse aggregate a materiale di natura organica ed inorganica: il biofilm. L'organizzazione in biofilm è un evento estremamente favorevole per la sopravvivenza poiché i microrganismi risultano immersi in matrici che li proteggono dall'effetto di sostanze tossiche e che forniscono supporti nutritivi necessari alla loro crescita e moltiplicazione. In alcuni casi la moltiplicazione può essere talmente favorita che si verifica una vera e propria "esplosione" di vita microbica in rete. Il biofilm si trasforma in biofouling ed a seguito di distacchi parziali di grossi strati pellicolari, per variazioni di flusso del torrente idrico, si verificano cambiamenti dell'acqua conduttata, che assume caratteristiche tali da essere rifiutata dall'utenza.

La formazione di biofilm consiste in un flusso dinamico di processi che comprendono attacchi reversibili ed irreversibili, colonizzazione e maturazione, distacco attivo o trasporto passivo e presenza di organismi superiori (protozoi e metazoi) che utilizzano il biofilm stesso per il loro nutrimento.

I biofilm sono ubiquitari e sono diffusi sia in ambienti molto ricchi di sostanze organiche e microrganismi, come le reti per il convogliamento dei liquami, sia in ambienti caratterizzati da carenza di nutrienti e con basso numero di microrganismi, come le reti di

distribuzione di acque potabili. Una situazione di equilibrio precario caratterizza i biofilm nelle acque potabili. In questi ambienti il numero di batteri vitali delle pellicole biologiche può raggiungere valori di 10^5 - 10^7 cellule/cm² in dipendenza della disponibilità di nutrienti e della qualità dei substrati chimico-fisici. Da considerare che il numero delle cellule planctoniche in questi ambienti varia da 10 ad un massimo di 10^3 /mL. Così, se si considerano i molti chilometri delle reti di distribuzione è chiaro che il biofilm rappresenta una riserva consistente di microrganismi. Occorre, inoltre, valutare le attività metaboliche che avvengono ad opera dei microrganismi, conseguentemente alle quali l'acqua si arricchisce di metaboliti indesiderati tra cui, ad esempio, nitriti prodotti da batteri autotrofi azoto-ossidanti, presenti in acque ricche di azoto [5].

La formazione di biofilm avviene a stadi successivi. Il primo di essi è il condizionamento, che consiste nella migrazione di molecole organiche sulle superfici da colonizzare. Si verifica successivamente la migrazione verso queste superfici ricche di nutrimento ed infine la crescita cellulare con utilizzo del substrato nutritivo. Alla fine del processo di formazione il biofilm appare come una struttura eterogenea, caratterizzata da ammassi di cellule e materiale organico ed inorganico e numerosi canali che permettono la circolazione e l'ingresso di una grande varietà di prodotti [6]. Nei suoi stadi maturi il biofilm consiste di uno strato basale distribuito in modo irregolare, cioè a macchie, ognuna di 5-10 µm di spessore, coperto da microcolonie impilate, che arrivano fino a 100-200 µm dallo strato sottostante. La morfologia delle cellule associate fisiologicamente nell'ambito delle microcolonie è diversa, per cui lo strato superficiale del biofilm è costituito da specie aggregate in consorzi. Queste formazioni tipiche che si innalzano verticalmente dalle superfici sono più o meno distanziate tra loro, in dipendenza delle caratteristiche fisico-chimiche del substrato, delle condizioni dello strato pellicolare basale, della disponibilità di nutrienti e dell'attività dei predatori. Protozoi, nematodi e batteri mobili frequentano questi spazi. Gli eucarioti come i protozoi ed i nematodi una volta in rete, per la scarsa integrità della stessa, se la situazione è di basso contenuto in cloro libero e la rete è colonizzata, vi permangono e vi si moltiplicano. Anche i batteri patogeni o gli indicatori di contaminazione fecale seguono lo stesso destino. In ambienti molto ricchi di nutrienti il biofilm assume l'aspetto di una spugna e poiché vengono prodotte sostanze extracellulari in quantità elevata che si depositano negli spazi tra le microcolonie, tutta la struttura appare confluyente e compatta.

Tra i fenomeni conseguenti alla presenza di biofilm nelle reti idriche quello corrosivo è uno dei più rilevanti. La corrosione causa enormi danni ecologici in tutte le aree geografiche e provoca perdite economiche dell'ordine miliardi di dollari. E' stato stimato che il 20% almeno di tutti i danni è dovuto alla corrosione batterica [7].

In condotte idriche metalliche può verificarsi, a seguito della presenza di batteri colonizzatori come i ferro e manganese precipitanti, i solfobatteri, i solfato riducenti ed anche batteri eterotrofi, una serie di fenomeni che portano alla formazione di accumuli di ossidi di ferro e di manganese. A causa della corrosione batterica si formano nelle tubature, zone pellicolari incrostate disomogeneamente distribuite. Queste pellicole incrostate, denominate tubercoli, possono aumentare in dimensione tanto da riuscire ad occludere il lume dei tubi. Periodicamente vanno incontro a sfaldamenti determinando la

produzione di acque maleodoranti, colorate e con materiali in sospensione di diversa consistenza.

La corrosione microbica o biocorrosione è un fenomeno dipendente da una serie di fattori come pH, potenziale redox, concentrazione di ossigeno, sali. La corrosione di metalli come il ferro, l'acciaio, il rame, ecc. consiste in un processo elettrochimico determinato dalla presenza di aree catodiche ed anodiche, che sono i siti di corrosione. Il potenziale elettrico dipende dall'attività del metallo, dalla composizione dell'acqua, ecc. Presso le aree anodiche avviene la dissoluzione del ferro, che rilascia elettroni, i quali si spostano attraverso il metallo al catodo e reagiscono con gli ioni H^+ , disponibili per la ionizzazione dell'acqua. Nel corso di questa reazione si forma, idrogeno atomico che polarizza il catodo proteggendolo, mentre gli ioni ossidrilici, in eccesso, reagiscono con il ferro formando idrossido ferroso. La presenza, nell'acqua, di ossigeno disciolto induce all'anodo reazioni di ossidazione a carico dell'idrossido ferroso che si trasforma in idrossido ferrico, che precipita sulle tubature e agisce come uno strato protettivo. Si riportano le reazioni principali:

Reazione anodica



Reazione catodica e polarizzazione



Formazione dell'idrossido ferroso



Formazione dell'idrossido ferrico



La formazione di idrossido ferrico precipitato assicura una situazione di equilibrio favorita da altre condizioni fisico-chimiche. Ad esempio la presenza di ioni calcio e di ioni carbonato determina una serie di reazioni che portano alla formazione di carbonato di calcio, il quale forma uno strato protettivo sulla superficie del metallo. In altre condizioni si determinano reazioni che promuovono ulteriori fenomeni corrosivi, con conseguenti situazioni di estremo degrado per le quantità eccessive di precipitati e di aree corrose. La presenza di microrganismi colonizzanti le tubature è un fattore che favorisce i processi corrosivi [8].

Microrganismi

Svariate specie microbiche fanno parte di una struttura così complessa come il biofilm, che presenta un mosaico di nicchie in cui esistono condizioni di elevato o basso potenziale, diversi valori di pH, di ossigeno, di nutrienti e di sostanze extracellulari. In queste nicchie è favorita la sopravvivenza di batteri microaerofili come *Legionella* e *Campylobacter* che riescono a svilupparsi anche in acque ben ossigenate.

I principali gruppi di microrganismi colonizzanti le tubature sono: batteri aerobi eterotrofi e microaerofili produttori di "fanghiglie", batteri anaerobi e batteri aerobi acidofili.

Batteri che producono "fanghiglie". Si tratta di microrganismi eterotrofi aerobi caratterizzati dalla capacità di produrre quantità elevate di polimeri extracellulari (esopolisaccaridi), che fungono da elemento di aggregazione per tutto il materiale particolato di diversa derivazione e composizione che circola nelle acque. Sono produttori di vere e proprie fanghiglie, i cui si trovano particolari tipi di enzimi in grado di agire su sostanze tossiche, tra cui i biocidi e di trasformarle in prodotti che sono assunti dalle stesse cellule batteriche come nutrienti [9]. Fanno parte di questo gruppo specie dei generi *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Legionella*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Enterobacter* ecc, tutti Gram negativi aerobi. La sola presenza di microrganismi, tra cui quelli finora descritti, è sufficiente ad innescare fenomeni corrosivi. Il biofilm è distribuito a macchie: le aree colonizzate presentano scarsità di ossigeno, che è consumato in grandi quantità dai microrganismi in fase di crescita attiva, mentre le zone libere presentano scarsità di ossigeno. Si creano, quindi, zone a diverso potenziale elettrico e si innescano, di conseguenza, i fenomeni corrosivi.

Le fanghiglie si arricchiscono di sostanze ferrose e di altro tipo che precipitano sui materiali immersi nell' acqua per le reazioni indotte da altre specie batteriche aerobie, come i ferro e manganese batteri, che sono in grado di ossidare i composti del ferro e del manganese determinandone la precipitazione e l'accumulo nel biofilm. In tal caso si possono formare sulle tubature particolari concrezioni denominate tubercoli, tipiche dei fenomeni corrosivi. I ferro e manganese batteri ossidano il ferro ferroso in ferro ferrico, il quale precipita come prodotto delle reazioni corrosive. I più comuni ferro ossidanti aerobi e produttori di fanghiglie, come *Sphaerotilus*, *Crenothrix* e *Leptothrix*, si trovano nell'ambiente in forma di filamenti ricoperti da guaine esterne di materiale proteico. I manganese precipitanti esplicano le loro funzioni metaboliche inducendo reazioni ossidative anche nei confronti di composti del manganese. Un tipo particolare di ferro ossidante è la *Gallionella ferruginea*, microaerofilo coinvolto in numerosi casi di biocorrosione di materiali ferrosi di diverso tipo, compreso l'acciaio. La *Gallionella ferruginea* induce la formazione di depositi voluminosi, che possono determinare l'occlusione di pozzi e di reti di distribuzione.

L'accumulo di ferro e manganese nel biofilm può essere la causa dei gravi casi di corrosione di materiali in ferro in sistemi di distribuzione, nell'ambito dei quali viene fatto uso di composti del cloro e del bromo. Lo ione ipocloroso reagisce con il ferro e il manganese e forma prodotti corrosivi. I cloruri di ferro e manganese agiscono provocando anche la formazione di veri e propri buchi su tubature di acciaio.

Altri microrganismi presenti in biofilm di reti idriche sono aerobi microaerofili filamentosi come *Caulobacter*, *Hyphomicrobium*, *Saprospira*, *Toxothrix*.

Quando i biofilm colonizzati di *Hyphomicrobium*, *Gallionella* o altri filamentosi come *Sphaerotilus* o *Leptothrix*, ecc., si staccano e si disperdono nelle acque circolanti si

producono acque nere e rosse. Sono riportati episodi di questo tipo in sistemi di distribuzione in Australia negli Stati Uniti, in Europa ed anche in Italia [10,11].

Batteri anaerobi. Tra i batteri anaerobi obbligati coinvolti in fenomeni di colonizzazione e di corrosione delle tubature i batteri solfati riducenti sono i più noti. Le condizioni di crescita per questo gruppo di microrganismi sono: assenza di ossigeno ed ambiente ridotto. Possono essere presenti anche in acque aerate, comprese quelle trattate con il cloro ed altri ossidanti, poiché sembra che possano tollerare l'ossigeno anche a basse dosi [9]. Appartengono a questo gruppo generi come *Desulfovibrio*, *Desulfatamaculum*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema*, *Desulfolubus*, i quali riducono i solfati producendo metaboliti corrosivi come idrogeno solforato, solfuro di ferro, CO_2 e H_2 [12]. In assenza di solfato alcune specie assumono la funzione di specie fermentanti e utilizzano composti organici come piruvato per produrre acetato, idrogeno e anidride carbonica. La promozione di reazioni corrosive a carico del ferro per produzione dell'enzima deidrogenasi, che provoca la depolarizzazione del catodo ultimamente è stata messa in dubbio. Da studi sperimentali è stato verificato come, in presenza di solfato riducenti, dopo 150 giorni di esposizioni a quantità di 0,1 o 0,5 mM di solfati (Na_2SO_4) nell'acqua si osservano su materiali metallici solchi di corrosione profondi 0,19-0,39 mm [13].

I solfato-riducenti, implicati nella corrosione della ghisa, dell'acciaio, del rame e nickel ed altri metalli, sono quasi sempre presenti nei siti di corrosione. Ciò non significa che sono causa dei fenomeni corrosivi ogni qualvolta se ne accerta la presenza nelle aree corrose. Solo la presenza di prodotti di corrosione localizzati attesta il loro reale coinvolgimento in questi fenomeni.

Batteri aerobi acidofili. Batteri aerobi autotrofi con optimum di crescita a pH 3, come i Tiobacilli (*Thiobacillus ferrooxidans* e *Thiobacillus thiooxidans*), possono intervenire in questi fenomeni producendo sostanze corrosive, come acido solforico dall'ossidazione dello zolfo inorganico e producendo composti, che promuovono la reazione di ossidazione del ferro ferroso in ferro ferrico [14].

Aspetti igienico-sanitari

Il biofilm ed i suoi prodotti (gli ammassi batterici, tubercoli, ecc.), possono ospitare microrganismi patogeni o potenzialmente tali. Tra essi sono da considerare con attenzione: *Legionella pneumophila*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium* sp., *Mycobacterium kansasii* e *Criptosporidium parvum*. Cellule di questi microrganismi sono state osservate in comunità biofilmanti mediante specifici anticorpi fluorocromati.

Cryptosporidium parvum è un protozoo parassita responsabile di epidemie di criptosporidiosi [15]. E' stato dimostrato che le oocisti di 5 micron possono sopravvivere in biofilm anche per parecchie settimane mantenendo l'infettività [16].

Pseudomonas e *Flavobacterium* sono opportunisti patogeni che suscitano particolare attenzione per le implicazioni di ordine sanitario connesse all'uso d'acqua contaminata in ambienti come quelli ospedalieri, in reparti pediatrici o chirurgici o in quelli per la cura delle ustioni [17]. *Pseudomonas* sp. può indurre gastroenteriti in neonati e la specie *aeruginosa* è nota per le infezioni delle ferite e delle ustioni. Inoltre è stato notato attualmente un aumento della virulenza di questi microrganismi.

La presenza di *Legionella* è stata rilevata in tubature che trasportano acqua fra 30 e 50°C [18]. *Legionella pneumophila* è uno dei pochi patogeni di origine idrica che occasionalmente ancora causa problemi negli Stati Uniti [18]. L'esposizione ad aerosol contenenti *Legionella pneumophila* può indurre polmoniti specialmente in persone con resistenza immunologica ridotta. La presenza di *Legionella pneumophila* è stata accertata in depositi e biofilm in reti idriche in Inghilterra.

Mycobacterium kansasii, batterio che può indurre infezioni polmonari, è stato rilevato in sistemi di distribuzione all'interno di edifici [18].

Un altro gruppo di microrganismi da considerare è quello degli *Aeromonas*. *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae* suscitano molta attenzione perchè sono sempre maggiori le prove che li annoverano tra i patogeni enterici che causano enteriti [18]. Sono stati frequentemente isolati dall'acqua potabile e si ipotizza che possano essere la causa di casi di diarrea di origine idrica.

Uno dei problemi connessi ai fenomeni di ricrescita è quello relativo alla presenza di coliformi, che come altri gruppi batterici, possono colonizzare le superfici delle tubature, entrando a far parte della flora microbica assai varia e numerosa che costituisce il biofilm e il biofouling, nei quali possono permanere ben protetti. Coliformi possono essere presenti in reti idriche per essere riusciti a sfuggire ai trattamenti di potabilizzazione. In questi casi, risultando danneggiati dall'effetto di biocidi o dalla presenza di metalli tossici, da valori di pH troppo alti o bassi, ecc. essi non sono isolabili sui normali terreni selettivi, poiché il desossicolato ed i sali di bile contenuti nei terreni di isolamento esplicano azioni inibitrici nei loro confronti. I coliformi danneggiati una volta colonizzati i biofilm possono riacquistare in tempi successivi le caratteristiche originarie, risultando così presenti nel corso dei controlli routinari.

La presenza in reti idriche di fenomeni di ricrescita in cui sono implicati coliformi è sempre un grosso problema. Una volta accertata che la causa della presenza di questi microrganismi è imputabile a fenomeni di ricrescita, essi perdono il ruolo di indicatori di contaminazione fecale. I nutrienti presenti nelle reti idriche supportano la crescita di questi batteri. Quantità di carbonio organico assimilabile superiori a 54 µ/L sono sufficienti per la loro ricrescita. E' stato verificato che i sistemi idrici colonizzati da coliformi sono soprattutto quelli riforniti di acque superficiali o da una mescolanza di acque superficiali e acque sotterranee. I punti delle reti in cui si insediano preferibilmente sono i siti di accumulo di ossidi di ferro (F₂O₃) che in quantità di 20 mg/L riescono a supportarne la crescita [19].

L'utilizzo del terreno mT7 agar, in grado di reperire i coliformi danneggiati, è consigliabile nei casi in cui si sospetta la presenza occulta di coliformi.

Le specie più frequentemente isolate di coliformi sono: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *E. agglomerans*, *E. alvii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxitoca*, *K. ozonae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *P. morganii*, *Shigella flexneri*, *S. dysenteriae* [20-21].

Conclusioni

Le reti idriche del territorio nazionale non sono immuni dal problema della ricrescita batterica. L'isolamento di microrganismi come gli attinomiceti e batteri dei generi *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Cromobacterium* è stata più volte segnalata in reti di distribuzione di acque potabili [19,22-26]. Anche la problematica della corrosione batterica interessa alcune zone del nostro territorio [24-26].

Le azioni che possono essere attuate per la prevenzione o riduzione di fenomeni di questo tipo sono molteplici ma non sempre risolutive. Oltre all'utilizzo di biocidi in associazione ad operazioni di pulizia meccanica delle tubature e all'uso di inibitori della corrosione, sono consigliate da molti autori, azioni indirizzate alla riduzione dei nutrienti nelle acque distribuite.

Riteniamo, comunque, che la prevenzione sia tra le azioni più efficaci. Oltre alla particolare attenzione mirata al trattamento delle acque prima dell'ingresso in rete in relazione alla riduzione del quantitativo di sostanze organiche e all'attenzione mirata ad una gestione della rete tale da evitare frequenti fenomeni di ristagno delle acque ed una clorazione sempre efficiente, è importante la rilevazione dei primi segnali che possono indicare il sorgere di fenomeni di ricrescita. In relazione a metodologie di indagine semplici ed appropriate volte alla evidenziazione dei primi segnali riteniamo importante il rilevamento delle forme batteriche filamentose, che sono sempre presenti nei casi di ricrescita e di corrosione. Inoltre occorre effettuare attente valutazioni ogni qualvolta si evidenziano conte batteriche totali elevate. Quantità elevate di microrganismi eterotrofi in rete, specialmente se rilevate intermittenemente, molto probabilmente originatesi dai periodici distacchi di porzioni di biofilm, sono in grado di mettere in evidenza fenomeni come quelli descritti. Anche la presenza discontinua di coliformi, ovviamente quando sia stata esclusa una contaminazione accidentale delle acque dall'esterno delle tubature, è un altro indice di proliferazione microbica in rete.

La valutazione attenta di diversi segnali può aiutare ad una diagnosi precoce dei fenomeni di ricrescita. Di conseguenza possono essere attuate azioni, come lavaggi delle reti o clorazioni periodiche spinte, ecc. che se effettuate quando i fenomeni sono ai primi stadi hanno diverse probabilità di successo.

BIBLIOGRAFIA

1. BAKER, R.M., SINGLETON, F.L., HOOD, M.A. Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Appl. Environm. Microbiol.* 1983, 46: 930-940.
2. DOMEK, M.J., ROBBINS, J.E., ANDERSON, M.E., MCFETERS, G.A. Metabolism of *Escherichia coli* injured by copper. *Can. J. Microbiol.* 1987, 33:57-62
3. MCFETERS, G.A., CAMPER, A.K. Enumeration of indicator bacteria exposed to chlorine. *Adv. Appl. Microbiol.* 1983, 20:177-193.
4. MCFETERS, G.A., BISSONETTE, G.K., JEZESKI, J.J. THOMSON, C.A., STUART, D.G. Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Appl. Microbiol.* 1974, 27: 823-829.
5. MACKERMESS, C.W., KEEVIL, C.W. 1991. In: *Nitrate and in nitrite in food and water*. Hill M.J. (Ed). Ellis Horwood, London. pp. 77-92.
6. ROGERS, J., KEEVIL, C.W. Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl. Environm. Microbiol.* 1992, 58(7): 2326-2330.
7. FLEMING, H.C. Eating away at the infrastructure-the heavy cost of microbial corrosion. *Wat. Qual. Intern.* 1995, 4: 16-19.
8. CHARACKLIS, W.G. & COOKSEY, K.W. Biofilms and microbial fouling. *Adv. Appl. Microbiol.* 1983, 29: 92-138.
9. TATNALL, R. E. Corrosion fundamentals. In "*A practical manual on microbiologically influenced corrosion*". Cap.1: 1-19. Kobrin G. (Ed.). NACE International 1993, ISBN 1-877914-56-8
10. VAN DER KOOIJ, D. Prevention of bacterial aftergrowth in drinking water distribution systems. *Water Supply* 1988, 6(57): 13-18
11. AULICINO, F.A., CONTU, A., RAMOUZ, E., MELONI, P., DEIDDA, A., PALA, A. Studio di un caso di corrosione batterica di un acquedotto di una regione italiana. *Rapporti ISTISAN* 1991, 91(4) ISSN-0931-1675
12. CRAGNOLINO, G., TUOVINEN, H. The role of sulphate-reducing and sulphur oxidizing bacteria in localized corrosion of iron-base alloys: a review. *Intern. Biodeterior.* 1984, 20:9-25
13. CHING-GANG, PENG, SHING-YI, S. & PARK, J.K. Modeling of anaerobic corrosion influenced by sulphate-reducing-bacteria. *Wat. Environ. Re.* 1994, 66(5): 707-715.
14. HARRISON, A.P. Jr.. The acidophilic Thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Ann. Rev. Microbiol.* 1984, 38:265-295
15. MACKENZIE, W.R., HOXIE, N.J., PROTOR, M.E ET AL. *N. Engl. J. Med.* 1994, 331: 161-167.
16. ROGERS, J., KEEVIL, C.W. 1995. In: *Protozoan parasites and water*. BETTS W.B. CASEMORE D., FRICKER C., SMITH WATKINS J. (Eds). Royal Society of Chemistry, Cambridge 1995. pp. 209-213.
17. VAN DER KOOIJ, D. Prevention of bacterial aftergrowth in drinking water distribution systems. *Water Supply* 1988, 6(57): 13-18
18. VAN DER WENDEL and CHARACKLIS, W.G. Biofilms in potable water distribution systems. In "*Drinking water microbiology*". Gordon McFeters (Ed), Springs Verlag, 1990, New York.
19. LECHEVALLIER, M.W., SCHULZ, W., LEE, R.G. Bacterial nutrients in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991, 57(3):857-862
20. LECHEVALLIER, M.W. Coliform regrowth in drinking water: a review. *J. Am. Water Works Assoc.* 1990, 80(11):74-86
21. HUDSON, L.O., HANKINS, J.W., BATTAGLIA, M. Coliforms in a water distribution system. a remedial approach. *J. Am. Water Works Assoc.* 1989, 75(11):564-568
22. AULICINO, F.A., CONTU, A., REPETTO, G., VOLTERRA, L., MELONI, P., PIETRANGELI, B. Primi cenni di isolamento di batteri filamentosi in una rete di distribuzione di acque potabili. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.* 1988, 64(1): 41-46.

23. AULICINO, F.A., DI GIROLAMO, I., MANCINI, L. Rilevamenti microbiologici in condotte di rifornimento idrico di un pozzo occluso. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.* 1990, 65(6): 575-580.
24. AULICINO, F.A., CONTU, A., RAMOUZ, E., MELONI, P., DEIDDA, A., PALA, A. Studio di un caso di corrosione batterica in un acquedotto di una regione italiana. *Rapporti ISTISAN* 1991, 91(4) ISSN-0391-1675, pp. 1-91.
25. GILLI, G., CARRARO, E., FEA, E., MARTINOTTI, G., AUDISIO, G., BOSSANO, A. Bacterial regrowth in distribution system. In: *International Symposium "Assessing and managing health risks from drinking water contamination: approaches and applications"*. Rome, 13-17 September 1994.
26. AULICINO, F.A., PALIN, L., ORSINI, P. Presenze di biofilm nella rete di un acquedotto piemontese. *L'Igiene Moderna*, 1996, 105: 29-40.

CRITERI DI QUALITA' DEI PRODOTTI CHIMICI USATI IN ACQUEDOTTISTICA

Osvaldo Conio⁽¹⁾, Massimo Ottaviani⁽²⁾

⁽¹⁾ Azienda Mediterranea Gas e Acqua (AMGA), Genova

⁽²⁾ Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'inquinamento ambientale sempre più diffuso e la necessità di aumentare la quantità di acqua da destinare al consumo umano per soddisfare le crescenti richieste, fa sì che sempre più spesso, l'acqua potabile sia il risultato di un trattamento chimico e fisico piuttosto che un prodotto derivante direttamente dal ciclo naturale.

L'utilizzo di trattamenti depurativi, non volendo considerare propriamente come tali, la sedimentazione effettuata nelle "piscine limarie" degli acquedotti romani, ed il carbone vegetale, usato, per migliorare il gusto e l'odore dell'acqua già in epoca preromana, si può far iniziare dalla seconda metà del secolo scorso quando a Londra venne costruito un impianto di filtrazione lenta alimentato con le acque del fiume Tamigi.

Con il passare degli anni e l'evolversi delle tecniche di depurazione sono stati via via introdotti nuovi trattamenti (Tabella 1).

Tabella 1. - Cronologia tecniche di depurazione

Trattamento	Località	Anno
Filtrazione lenta	Londra - UK	1850
Chiarificazione con coagulanti inorgan.	USA	1880
Disinfezione con ozono	Olanda	1893
Disinfezione con cloro gas	Niagara Falls - USA	1912
Disinfezione con ipoclorito di calcio	USA	1913
Disinfezione con cloroamine	Ottawa - Canada	1915
Abbatt. di gusti e odori con GAC e PAC	USA e Germania	anni 30
Abbatt. di gusti e odori con ozono	Whiting - USA	1941
Disinfezione con biossido di cloro	Niagara Falls - USA	1944
Florurazione	USA	1945
Chiariflocculazione con polielettroliti org.	USA	1967
Denitrificazione biologica	Francia	1983
Uso di carbone biologicamente attivo	Francia	1984
Ozoflocculazione	Francia	1985
Microfiltrazione su membrane	Francia	1990

La Comunità Economica Europea, con la direttiva 75/440/CEE, ha identificato tre livelli di impianti tecnologici atti a rendere potabili le acque di superficie, che comunque fanno uso di uno o più reagenti chimici.

Il primo e più semplice livello (A 1) consiste in un trattamento fisico (per es. una filtrazione su letto a sabbia) seguito da una disinfezione (per es., cloro attivo).

Il secondo livello (A 2), intermedio, prevede una combinazione di normali trattamenti chimici e fisici; un possibile schema di trattamento è la sequenza: preclorazione - coagulazione - flocculazione - decantazione - filtrazione - disinfezione finale.

Il terzo, più complesso livello (A 3) prevede un trattamento chimico - fisico spinto; un possibile schema di trattamento è la sequenza: clorazione al break-point - coagulazione - flocculazione - decantazione - filtrazione - passaggio su letto di carbone attivo - disinfezione finale.

In corrispondenza dei tre livelli di complessità tecnologica degli impianti di potabilizzazione vengono definiti dalla CEE altrettanti livelli di qualità delle acque da trattare. E' chiaro che i trattamenti più semplici (A 1) possono essere adottati solo per le acque poco contaminate, mentre le più contaminate richiedono i trattamenti più complessi e le acque troppo contaminate non possono essere utilizzate per uso potabile neanche previo trattamento.

Anche le acque sotterranee, un tempo ritenute qualitativamente migliori, possono contenere sostanze in quantità indesiderabile, sia di origine naturale (ferro, manganese, magnesio, ecc.) che di origine antropica (nitrati, metalli, solventi organici, pesticidi, ecc.). E' necessario molto spesso sottoporre anche le acque sotterranee a trattamenti fisici e chimici.

I trattamenti di potabilizzazione possono utilizzare un gran numero di prodotti chimici; un primo e necessariamente approssimato "censimento", effettuato esaminando e comparando le varie normative vigenti e le attività di normazione in corso di elaborazione (CEN, UNICHIM), ha evidenziato l'uso di 96 composti così classificabili:

- prodotti per la disinfezione e/o l'ossidazione (28);
- prodotti per la correzione del pH e/o della mineralizzazione (18);
- prodotti per coagulazione/flocculazione (20);
- prodotti inibitori di correzione e/o incrostazione (10);
- prodotti diversi (20).

Nelle Tabelle 2, 3, 4, 5 e 6 sono riportati gli elenchi di tali sostanze.

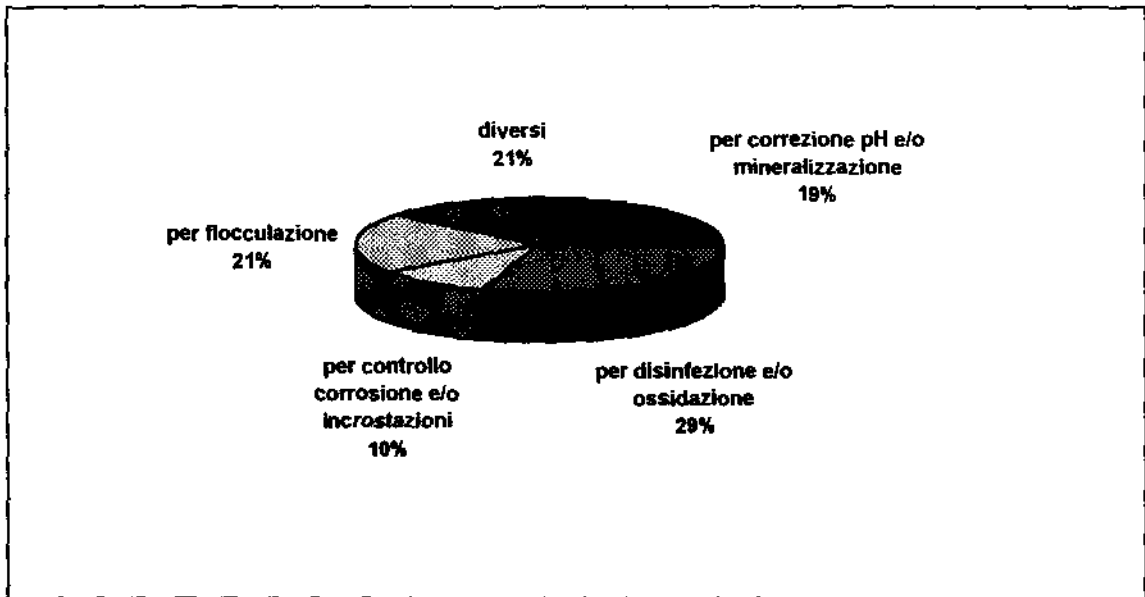


Figura 1. - Suddivisione dei vari reattivi secondo l'uso.

Tabella 2. - *Prodotti chimici usati per la disinfezione e/o ossidazione*

Cloro	Ammonio Idrossido
Sodio Ipoclorito	Ammonio Cloruro
Calcio Ipoclorito	Ammonio Solfato
Magnesio Ipoclorito	Diossido di Zolfo
Sodio Clorito	Sodio Bisolfito
Acido Cloridrico	Sodio Tiosolfato
Perossido di Idrogeno	Sodio Metabisolfito
Potassio Permanganato	Sodio Solfito
Ossigeno	Calcio Solfito
Ozono	Argento
Acido Peracetico	Argento Cloruro
Potassio Monopersolfato	Argento Solfato
Piretrine	Sodio Dicloroisocianurato
Ammoniaca	Sodio Persolfato

Tabella 3. - *Prodotti per la correzione del pH e/o mineralizzazione*

Sodio Idrossido	Magnesio Carbonato
Sodio Carbonato	Magnesio Idrossido
Sodio Bicarbonato	Magnesio Idrogenosolfato
Sodio Cloruro	Magnesio Ossido
Calcio Ossido	Dolomite Semicalcinata
Calcio Idrossido	Diossido di Carbonio
Calcio Carbonato	Acido Solforico
Calcio Cloruro	Acido Fosforico
Calcio Solfato	Calcio Idrogenosolfato

Tabella 4. - Prodotti chimici usati per la coagulazione e/o flocculazione

Alluminio Solfato	Ferro Clorosolfato
Sodio Alluminato	Poly (Diallyldimethylammonium Chloride)
Alluminio Polidrossicloruro	Poliacrilamidi
Alluminio Polidrossisolfato	Epicloridrina-dimetilamina (EPI-DMA)
Alluminio Fluorosolfato	Sodio Alginato
Alluminio Cloruro	Xantano
Alluminio Polidrossiclorosilicato	Amido
Bauxite	Poliamine
Ferro Solfato (II)	Tannino
Ferro Solfato (III)	Ferro Cloruro (III)

Tabella 5. - Prodotti inibitori di corrosione e/o incrostazioni

Sodio Esametafosfato	Sodio Polifosfato vetroso
Polifosfati Alcalini	Monosodio Fosfato anidro
Zinco e Sodio Polifosfato	Disodio Fosfato anidro
Zinco, Sodio e Potassio Polifosfato	Tetrasodio Pirofosfato
Sodio, Calcio e Magnesio Polifosfato	Sodio Tripolifosfato

Tabella 6. - Reagenti chimici impiegati per vari usi

Sodio Silicato	Carbone attivo in polvere
Sodio Esafluorosilicato	Pomice
Sodio Fluoruro	Bentonite
Acido Esafluorosilicico	Zeoliti al manganese
Carbone attivo granulare	Allumina
Antracite	Silicoalluminati Espansi
Polarite	Resine scambiatrici
Terre di diatomee	Acido Acetico
Rame solfato	Etanolo
Baritina	Metanolo

In Italia il modesto uso di risorse idriche superficiali (11,9% del totale nel 1987) ed il livello di inquinamento a parte qualche caso particolare, non eccessivamente elevato, fa sì che il numero di reagenti effettivamente usati sia notevolmente inferiore.

A tale riguardo, una indagine effettuata dalla Federgasacqua alla fine del 1994, che ha coinvolto 83 acquedotti (eroganti circa il 30% dell'acqua potabile in italiana) ha evidenziato la situazione seguente:

Tabella 7. - Prodotti chimici usati per la disinfezione e/o ossidazione

Prodotto	N° utilizzi segnalati
Ipoclorito di sodio	67
Biossido di cloro	47
Ozono	14
Cloro	6
Ipoclorito di calcio	4
Cloroamine	1

Tabella 8. - Prodotti chimici usati per la correzione del pH e/o della mineralizzazione

Prodotto	N° utilizzi segnalati
Idrossido di sodio (solido/soluzione)	8
Idrossido di calcio	4
Acido cloridrico	2
Acido solforico	1
Anidride carbonica	1
Dolomite semicalcinata	1

Tabella 9. - Prodotti chimici organici usati per la coagulazione e flocculazione

Prodotto	N° utilizzi segnalati
Poliacrilamidi anioniche e non ioniche	2
Sodio alginato	2
Poliamine	1
Poliacrilammidi cationiche	1
Xantano	1

Tabella 10. - Prodotti chimici inorganici usati per la coagulazione e flocculazione

Prodotto	N° utilizzi segnalati
Polidrossicloruro/Polidrossiclorosolfato di Al	19
Cloruro ferrico	9
Solfato di alluminio (solido/soluzione)	4
Clorosolfato ferrico	1
Silicato di sodio	1

Tabella 11. - Prodotti chimici usati come inibitori di corrosione e/o incrostazione

Prodotto	N° utilizzi segnalati
Tripolifosfato di sodio	4

IL PROBLEMA DEI REATTIVI UTILIZZATI NEL TRATTAMENTO DELLE ACQUE: I VARI APPROCCI NORMATIVI

Storicamente gli U.S.A. sono stati la prima nazione che ha provveduto a normare la qualità dei reagenti utilizzati nei trattamenti di potabilizzazione con norme di tipo tecnologico applicativo edite all'AWWA (Tabella 14) e soprattutto con norme igienico sanitarie contenute nel *Water Chemicals Codex* del *Committee on Water Treatment Chemicals* del *National Research Council* (1982).

Tabella 14. - Norme AWWA (aggiornamento al 1991).

American Water Works Association (AWWA) Standards	
A100 - 84	AWWA Standard for Water Wells
B100 - 89	AWWA Standard for Filtering Material
B200 - 88	AWWA Standard for Sodium Chloride
B201 - 87	AWWA Standard for Soda Ash
B202 - 88	AWWA Standard for Quicklime and Hydrate Lime
B300 - 87	AWWA Standard for Hypochlorites
B301 - 87	AWWA Standard for Liquid Chlorine
B302 - 90	AWWA Standard for Ammonium Sulfate
B303 - 88	AWWA Standard for Sodium Chlorite
B402 - 90	AWWA Standard for Ferrous Sulfate
B403 - 88	AWWA Standard for Aluminium Sulfate - Liquid, Ground, or Lump
B404 - 87	AWWA Standard for Liquid Sodium Silicate
B405 - 89	AWWA Standard for Sodium Aluminate
B406 - 87	AWWA Standard for Ferric Sulfate
B407 - 88	AWWA Standard for Liquid Ferric Chloride
B451 - 87	AWWA Standard for Poly (Diallyldimethylammonium Chloride)
B452 - 90	AWWA Standard for EPI - DMA Polyamines
B501 - 88	AWWA Standard for Caustic Soda
B502 - 88	AWWA Standard for Sodium Polyphosphate, Glassy (Sodium Hexametaphosphate)
B503 - 89	AWWA Standard for Sodium Tripolyphosphate
B504 - 88	AWWA Standard for Monosodium Phosphate, Anhydrous
B505 - 88	AWWA Standard for Disodium Phosphate, Anhydrous
B510 - 89	AWWA Standard for Carbon Dioxide
B550 - 90	AWWA Standard for Calcium Chloride
B600 - 78	AWWA Standard for Powdered Activated Carbon
B601 - 88	AWWA Standard for Sodium Metabisulfite (Sodium Pyrosulfite)
B602 - 86	AWWA Standard for Copper Sulfate
B603 - 88	AWWA Standard for Potassium Permanganate
B604 - 74	AWWA Standard for Granular Activated Carbon
B701 - 89	AWWA Standard for Sodium Fluoride
B702 - 89	AWWA Standard for Sodium Silicofluoride
B703 - 89	AWWA Standard for HydroFluossilic Acid

Il Water Chemical Codex definisce, per ciascun reattivo, una concentrazione massima di impurezze (RMIC: recommended maximum impurity content) che viene stabilita in

funzione della massima concentrazione del contaminante ammissibile nell'acqua potabilizzata.

Per stabilire i valori delle varie RMIC è necessario definire per ciascun prodotto una D.R. (dose di riferimento) che rappresenta il più elevato dosaggio abitualmente usato.

Definita la D.R. è possibile, mediante la seguente formula matematica, valutare la RMIC corrispondente.

$$RMIC = \frac{MCL}{DR \cdot SF} \cdot 10^6 \text{ mg/kg}$$

dove:

RMIC: è il livello massimo di impurezze in mg/kg di prodotto

SF: fattore di sicurezza fissato a 10

DR: è la dose di riferimento espressa in mg di sostanza per litro di acqua trattata

MCL: maximum contaminant level (corrisponde alla CMA della direttiva CEE 778/80)

L'approccio europeo al problema si è sviluppato a livello dei singoli Stati e in generale rispetto agli USA si è tenuto in maggior conto la presenza dei metalli presenti nei reattivi chimici.

La legge francese prevede che chi tratta e/o distribuisce acqua a scopo potabile deve sottostare a due tipi di vincoli: un vincolo di risultato e un vincolo di mezzi.

Il vincolo di risultato corrisponde al raggiungimento delle concentrazioni massime di accettabilità, sostanzialmente analoghe a quelle italiane in quanto derivanti dalla introduzione, nella legislazione francese, della direttiva comunitaria 778/80 che sta alla base del nostro D.P.R. 236/88.

Il vincolo strumentale prevede, tra l'altro, che tutti i prodotti chimici impiegati nei trattamenti di potabilizzazione siano approvati dal *Ministère de la Santé*.

Secondo le circolari applicative, l'approvazione richiede che i prodotti chimici raggiungano un predefinito grado di purezza sia per quanto riguarda i parametri tossici, sia per quanto riguarda i parametri indesiderabili.

La regola è che l'apporto di una sostanza tossica attraverso i reattivi non deve essere superiore a 1/10 della CMA nell'acqua potabile; per es., se si utilizza un reattivo chimico alla dose di 100 mg/l e questo reattivo è impuro per mercurio (potrebbe essere il caso dell'idrossido di sodio), poiché la CMA per il mercurio è 1mg/l, il reattivo non può apportare più di 0.1mg di mercurio, il che significa che il tenore di mercurio nel reattivo non deve superare 1 mg/Kg.

Per i parametri indesiderabili è invece sufficiente che l'apporto del reattivo non determini il superamento della CMA.

Anche in Francia, sotto l'egida dell'organismo di normalizzazione AFNOR, sono state preparate delle schede tecniche per i singoli prodotti.

Nel Regno Unito, sotto il profilo tecnico, il *Department of the Environment, Drinking Water Division*, nel 1989 ha licenziato un documento (*Fifteenth Statement, March 1989*) nel quale vengono elencati e descritti i composti per il trattamento delle acque destinate al consumo umano, che presentano rilievi di tipo sanitario. L'inclusione in tale elenco non comporta un giudizio tecnico sulla efficienza dei composti citati; questi sono raggruppati in categorie, che vanno dai coagulanti organici, ai composti chimici inorganici, ai coadiuvanti di flocculazione, ecc..

Il criterio di purezza è che l'acqua trattata rimanga comunque entro i limiti previsti nella direttiva 80/778/CEE. Sotto il profilo normativo, la regolamentazione del 1989 (n.1147) vieta ogni trattamento delle acque destinate alla pubblica alimentazione, a meno che non avvenga in accordo con quanto prescritto dal citato *Statement* oppure sia stato esplicitamente approvato dall' Autorità governativa.

In Germania la legge del 5 dicembre 1990 elenca i composti utilizzabili, l'uso, le dosi e i possibili sottoprodotti di reazione, con i limiti alla loro formazione.

L'Olanda utilizza il sistema della lista positiva ed ha pubblicato le schede di prodotti ammessi, con l'indicazione di uso, dose e criteri di purezza.

In Belgio un decreto reale, nell'adottare la più volte citata direttiva comunitaria 80/778/CEE, nell'allegato IV elenca i coadiuvanti tecnologici autorizzati per il trattamento dell'acqua, indicando altresì la dose massima ammessa.

L'Italia a differenza di altre nazioni, al momento risulta carente di una legislazione specifica, nonostante il decreto del ministero della Sanità del 26 maggio 1991 stabilisca:

"Qualora nell'eventuale trattamento di potabilizzazione delle acque venissero utilizzati flocculanti o coadiuvanti della flocculazione e in tutti i casi in cui siano utilizzate sostanze e prodotti tendenti a migliorare le caratteristiche igieniche (quali polifosfati, ozono, sali metallici ecc.) se non vi è normativa specifica, è necessario accertare il grado di purezza e l'innocuità delle concentrazioni residue delle sostanze o prodotti utilizzati".

Tale lacuna oltre ad essere causa di una minore tutela del gestore dell'acquedotto e ovviamente dell'utente danneggia anche i produttori ed i commercianti di reagenti di qualità, sfavoriti dalla concorrenza di prodotti scadenti o perlomeno inadatti a questa specifica funzione.

Per coprire tale carenza UNICHIM, anticipando il lavoro in corso di effettuazione in sede europea dal CEN (*Comunità Europeen de Normalization*), ha recentemente pubblicato il manuale n° 166 "Prodotti chimici per il trattamento delle acque destinate al consumo umano". In tale manuale sono contenute n° 62 schede relative ad altrettanti prodotti chimici.

"La scheda" contiene varie informazioni ed è strutturata in 7 distinti capitoli che si riferiscono nell'ordine a :

- 1- Identificazione
- 2- Proprietà chimico fisiche
- 3- Composizione - Criteri di purezza - Processo produttivo
- 4- Uso pratico nel trattamento dell'acqua
- 5- Controllo della Qualità - Metodi analitici
- 6- Manipolazione e stoccaggio
- 7- Procedure di emergenza.

La procedura utilizzata per fissare le specifiche di purezza è quella indicata dal Water Chemical Codex.

La relazione seguente, utilizzata per il calcolo dei massimi livelli di impurezza, risulta cambiata solo nelle sigle usate per uniformarla alla legislazione europea.

$$\text{RMIC} = \frac{\text{CMA}}{\text{DR} \cdot \text{SF}} \cdot 10^6 \text{ mg/kg}$$

dove:

RMIC: è il livello massimo di impurezze in mg/kg di prodotto

SF: fattore di sicurezza fissato a 10

DR: è la dose di riferimento espressa in mg di sostanza per litro di acqua trattata

CMA: concentrazione massima ammissibile (D.P.R. 236/88) espressa in mg/l.

Calcolati i relativi RMIC per ciascuna sostanza tossica o indesiderabile tipicamente presente nel reattivo (derivante o dalle materie prime utilizzate o dal processo produttivo e/o conservativo), si confrontano con i livelli di purezza correntemente disponibili sul mercato, se la produzione è costantemente migliore, si fissa come impurezza massima ammessa quella riscontrata realmente, in caso contrario si adotta il valore di RMIC calcolato (Figura 3, Tabella 15 e Tabella 16).



Figura 3. - Procedura utilizzata per la formulazione degli standard qualitativi dei reagenti usati nella potabilizzazione

Tabella 15. - Dosi di riferimento (DR) fissate per alcuni reattivi da UNICHEM

Cloro	15 mg/l (Cloro attivo)
Ipoclorito di Sodio	15 mg/l (Cloro attivo)
Clorito di Sodio	2 mg/l (ClO_2^-)
Acido Cloridrico	25 mg/l (HCl)
Polidrossicloruro di Alluminio	28 mg/l (Al_2O_3)
Cloruro Ferrico	10 mg/l (Fe)
Solfato di Alluminio	28 mg/l (Al_2O_3)
Poliacrilamidi	0,4 mg/l
Idrossido di Sodio	100 mg/l (NaOH)

Tabella 16. - Tabella utilizzata per la formulazione degli standard qualitativi (metalli tossici) dei reagenti usati nella potabilizzazione.

	CMA mg/l nell'acqua potabile Direttiva CEE 778/90	RMIC conc. max nel prodotto Regola del decimo	Qualità della produzione commerciale	Conc. max nel prodotto proposto
As	0.050			
Cd	0.005			
Cu	0.050			
Cr	0.050			
Hg	0.001			
Ni	0.050			
Pb	0.050			
Sb	0.010			
Se	0.010			

In pratica, dal lavoro fatto da UNICHIM, emerge che in tutti i casi la qualità dei prodotti commerciali è sempre caratterizzata da un contenuto di inquinanti inferiore ai vari RMIC calcolati. Gli standard fissati (ultima colonna della Tabella 16) risultano pertanto sempre inferiori a tali valori calcolati.

Inconvenienti causati dall'utilizzo di prodotti chimici nei trattamenti di potabilizzazione

L'uso di prodotti chimici, qualunque esso sia, deve essere fatto con la piena consapevolezza che non esiste il "reagente ideale" che sparisce senza lasciare traccia indesiderata della propria azione dopo aver raggiunto lo scopo per il quale è impiegato. Al contrario l'uso di uno o più reagenti provoca sempre, in misura più o meno consistente, i seguenti fenomeni:

- formazione di prodotti indesiderati a seguito di reazioni tra il reattivo e le sostanze che naturalmente o per effetto dell'inquinamento possono essere presenti nell'acqua da trattare;
- permanenza nell'acqua trattata di un residuo del reattivo usato;
- introduzione di sostanze contenute nel reattivo a livello di impurezze o come coadiuvanti tecnologici.

La formazione di prodotti indesiderati e la permanenza di residui del reattivo usato può essere minimizzata e controllata entro i limiti di sicurezza sanitaria adottando una configurazione impiantistica idonea ed una attenta gestione del trattamento. Nel caso di processi complessi, assume grande rilevanza il sistema di controllo qualitativo gestionale attuato sia con le normali analisi di laboratorio che con sistemi di monitoraggio on-line.

L'introduzione nell'acqua trattata di sostanze tossiche o indesiderabili, contenute come impurezze nei reattivi impiegati, può essere invece controllata mediante l'adozione di reagenti caratterizzati da un basso livello di contaminanti. Tali impurezze possono avere origine dalle materie prime impiegate, dal tipo di processo produttivo, volutamente aggiunte come adiuvanti tecnologici, che a volte sono previsti per impieghi diversi dal trattamento di potabilizzazione, o infine dalle modalità e dal tempo di conservazione del reattivo.

Le impurezze tipiche che possono essere veicolate all'acqua potabile dai reattivi usati nei trattamenti sono innumerevoli, le più significative sono riportate nella Tabella 17.

Tabella 17. - *Impurezze tipiche dei prodotti utilizzati nella potabilizzazione*

Prodotto	Impurezze tipiche
Ipoclorito di sodio	Clorato di sodio, ferro, bromato, metalli pesanti
Diossido di cloro	Quelle dei reagenti di sintesi
Clorito di sodio	Clorato e nitrato di sodio, metalli pesanti
Ozono	-
Idrossido di sodio	Clorato di sodio, ferro, metalli pesanti
Idrossido di calcio	Metalli pesanti

segue Tabella 17

Acido cloridrico	Ferro, alogenoderivati organici, fluoruri, cloro, metalli pesanti
Polidrossicloruro di alluminio	Metalli pesanti
Cloruro ferrico	Metalli pesanti
Solfato di alluminio	Metalli pesanti
Poliacrilamidi	Acrilamide
Alginato di sodio	Metalli pesanti
Tripolifosfato di sodio	Metalli pesanti
Permanganato di potassio	Metalli pesanti
Cloruro di sodio	-
Acqua ossigenata	Metalli pesanti
Bisolfito di sodio	Metalli pesanti
Acido fosforico	Metalli pesanti
Sabbie silicee	-
Carbone attivo granulare polvere	Idrocarburi policiclici aromatici
Antracite	Idrocarburi policiclici aromatici

BIBLIOGRAFIA

1. WATER CHEMICALS CODEX. Committee on water treatment chemicals food and nutrition board. Assembly of life sciences. *National Research Council* 1982
2. MASSCHELEIN, W.J. *La technique de l'eau et de l'assainissement* ottobre/novembre 1983: 442-443.
3. BELGIO. Decreto reale relativo alla qualità dell'acqua distribuita mediante rete. 27/4/84
4. Guideline quality of materials and chemicals for drinking water supply. *Chief Inspectorate of Public Health and Environmental Protection*. Kiwa, Olanda.
5. REGNO UNITO. The water supply (water quality) regulations. Committee on chemicals and materials of construction for use in public water supply and swimming pools. *Department of Environment, Fifteenth Statement* 1989.
6. MONTIEL, A. *Reactif chimiques utilisés dans le traitement des eaux destinées a la consommation humaine*. *T.S.M/Eau* gennaio 1992.
7. Bekanntmachung der Neufassung der Trinkwasserverordnung 5 dicembre 1990
8. EUROPEAN-Standard Draft Standard di prodotti chimici utilizzati per il trattamento di acqua potabile. *CEN TC 164 WG9* 1992/93
9. MANUALE n° 166 "Prodotti chimici per il trattamento delle acque destinate al consumo umano (in corso di pubblicazione)" *Unichim* 1993
10. CONIO, O., ZAMBONI, V., MEUCCL, L., BORGIOLO, A. Prodotti chimici impiegati nel processo di potabilizzazione - Necessità di una loro normazione. *Acque per uso potabile. Gruppo Scientifico Italiano Studi e Ricerche* 1992
11. CONIO, O. La ricerca per la massima affidabilità dei reagenti usati nei processi di potabilizzazione. *Acque Acquedotti Qualità Originale. Ecotec* 1982.
12. WHO - Guidelines for Drinking-Water Quality 1992
13. CONIO, O., LASAGNA, M., RIGANTI, V. I prodotti chimici utilizzati nei processi di potabilizzazione. *Impegno Ambientale*. Ottobre 1984. Nota I.
14. CONIO, O., LASAGNA, C., RANERI, RIGANTI, V. I prodotti chimici utilizzati nei processi di potabilizzazione. *Impegno Ambientale*. Novembre-Dicembre 1984. Nota II.

QUALITÀ DELLE ACQUE SOTTERRANEE: METODI DI PREVENZIONE E CONTROLLO

Adriano Zavatti

Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente - Emilia Romagna, Bologna

1.1 Premessa

La protezione delle risorse idriche riveste un ruolo di enorme rilievo nell'ambito della politica complessiva di tutela dell'ambiente, sia in paesi industrializzati, sia in quelli in via di sviluppo. Si tratta infatti nei primi spesso di condurre un risanamento di condizioni già in parte compromesse da una scarsa attenzione ai problemi ambientali negli anni della massima industrializzazione poste bellica; nei secondi di evitare gli stessi errori, sulla base dell'esperienza acquisita, nello sviluppo avviato.

Le risorse idriche giocano un ruolo determinante nello sviluppo socio-economico e l'esperienza compiuta insegna che le spese per studi e interventi di prevenzione sono sempre paganti anche economicamente, oltre che evitare l'esposizione della popolazione al rischio sanitario.

I paesi a più antica tradizione industriale, come gli stati nord-europei e del nord-America oggi impegnano grandi capitali pubblici e privati nella bonifica di siti inquinamenti industriali, che via via vengono abbandonati e che rivelano situazioni di inquinamento del suolo e delle acque sotterranee di grandi dimensioni.

L'inquinamento del suolo e delle acque sotterranee crea notevoli problemi per l'approvvigionamento idrico civile, zootecnico, agricolo e, talvolta, industriale, e richiede a volte veri e propri interventi di emergenza di protezione civile.

In Italia negli ultimi 10 anni si sono avuti alcune decine di casi di emergenza per inquinamento di acque sotterranee per scarichi abusivi di acque non trattate, di rifiuti tossici o di percolazione di liquami zootecnici e civili, con la sospensione del prelievo ed il ricorso alla distribuzione idrica con autobotti o acquedotti di emergenza.

Il problema è assai grave se si pensa che l'80% degli acquedotti Italia si approvvigionamenti da acque sotterranee.

Per questo motivo il Consiglio Nazionale delle Ricerche attraverso il Gruppo Nazionale per la Difesa delle Catastrofi Idrogeologiche ha avviato programmi di studio e ricerca, sulla valutazione della vulnerabilità degli acquiferi (oltre che su piene, frane ed eventi meteorici estremi) con un tentativo di compilazione di Carte di Vulnerabilità degli acquiferi all'inquinamento, per molte aree italiane, con una apposita metodologia.

Il Gruppo ha inoltre lavorato per la redazione di norme tecniche per la perimetrazione di zone di salvaguardia delle opere di captazione delle acque sotterranee nell'ambito delle quali inserire il monitoraggio quali-quantitativo degli acquiferi per il controllo

della evoluzione spazio-temporale di fenomeni indesiderati.

Tutto questo è basato sulla convinzione che il mantenimento della qualità naturale delle acque sotterranee, può essere ottenuta con una più complessiva politica di pianificazione d'uso del territorio, con la localizzazione delle potenziali fonti inquinanti nelle zone a minore vulnerabilità e con l'adozione di moderni criteri di protezione, da applicare sia alle fonti inquinanti puntuali, sia a quelle diffuse come quelle agricole.

La conoscenza della vulnerabilità del territorio basata su un'analisi scientifica che presuppone la raccolta dei dati salienti e la loro elaborazione e restituzione cartografica, deve essere diffusa a tutti i livelli decisionali, sia per l'adozione di normative più efficaci regionali o locali, sia per consentire a chi le gestisce di cogliere a pieno l'importanza e le reali motivazioni di fondo delle scelte compiute, valorizzando, tra l'altro, l'azione amministrativa con elevati contenuti tecnico-scientifici. Si tratta, insomma, di diffondere non un "ecologismo" generico o di bandiera, ma di far crescere, anche nei cittadini e nei titolari delle attività produttive potenzialmente inquinanti, una "cultura dell'ambiente", che risponda più in generale, alle indicazioni comunitarie in materia.

Il quadro che così si viene a definire non può dirsi completo senza un razionale ed efficace sistema di "monitoraggio", che identifichi le variabili ambientali più rilevanti, le tenga sotto continua osservazione, elabori i dati raccolti e ne curi la diffusione.

In tal modo l'azione di "governo del territorio" nelle sue fasi di *programmazione, pianificazione e gestione* potrà dirsi aderente alle reali esigenze di conservazione e miglioramento della qualità delle risorse.

Plinio (I sec. d.C.) nella sua "Storia Naturale" affermava che "*tales sunt aquae, qualis terram per quam fluunt*", ossia aveva intuito che le acque di circolazione superficiale e sotterranee erano caratterizzate da una composizione chimica, che ad esse era conferita dai terreni attraversati.

I complessi processi chimico-fisici, biochimici e biologici che sono oggi studiati, partendo dalla composizione delle acque e dalle condizioni ambientali naturali non sono altro che una applicazione scientificamente evoluta di quella osservazione. Ciò che studiamo, in definitiva, non è semplicemente l'acqua nel suo rapporto con i caratteri fisiografici di un territorio, ma anche il comportamento di una *soluzione acquosa* circolante al di fuori della superficie terrestre, nell'atmosfera, sulla superficie stessa e sotto di essa. Le variazioni della composizione di questa soluzione acquosa avviene nei vari passaggi da un corpo idrico ad un altro o nel percorso interno al corpo stesso.

Quello che definiamo "inquinamento" non è altro che un'ulteriore variazione di tale composizione, dovuta alla presenza di attività umane, che apportano materiali organici o inorganici alle acque, direttamente o indirettamente, in modo più o meno intenso.

1.2. La diffusione degli inquinanti e la cartografia di vulnerabilità degli acquiferi

Diversamente rispetto alle acque superficiali, le sotterranee sono più protette nei confronti di possibili inquinanti, ma, una volta che gli inquinanti sono stati assorbiti dai

sistemi idrici, la loro evoluzione presenta caratteri forse più preoccupanti, sia per l'impossibilità di demolizione biologica delle sostanze organiche, sia di eliminazione di quelle inorganiche spesso interagenti con la matrice e quindi rilasciati a tempi lunghi, sia, soprattutto, per il ricambio estremamente lento dei corpi idrici sotterranei, rispetto a quelli superficiali.

Lo stesso controllo delle fonti potenziali di inquinamento, proprio perché sfugge normalmente ad una verifica diretta che comporta la conoscenza dei complessi meccanismi geoidrologici, che sovrintendono all'espressione e diffusione negli acquiferi, risulta più difficile.

Le possibili fonti inquinanti ed i meccanismi diretti o indiretti di scadimento qualitativo sono innumerevoli. Ad essi si associano spesso fenomeni di depauperamento quantitativo per il sovrasfruttamento degli acquiferi, già di per sé gravi, ma con incidenze anche sul richiamo di acque qualitativamente scadenti o sulla accelerazione del rinnovamento idrico e quindi con il più rapido arrivo in falda di acque, alle quali una infiltrazione più lenta potrebbe consentire una autodepurazione attraverso gli strati di terreno.

Il suolo ed il sottosuolo infatti sono sede di importanti processi chimico-fisici e biochimici di attenuazione della concentrazione di inquinanti. In particolare il suolo agrario, sede di una intensissima attività chimico-fisica e biologica, costituisce il maggior baluardo contro la diffusione degli inquinanti nella sottostante zona non satura ed infine in quella satura.

L'intensità dei fenomeni è fortemente ridotta in queste due zone, se si eccettuano la diluizione e solubilizzazione massime in zona satura d'acqua.

Pertanto qualora un inquinante organico o inorganico raggiunga il sottosuolo senza la mediazione del suolo, il rischio di diffusione in falda diventa massimo, poiché essa non può subire che limitatamente i processi attivi, che in esso ne riducano la concentrazione. L'elencazione di tali processi è indicata in fig. I; sarebbe qui troppo lunga la loro esposizione nei dettagli.

La presenza di affioramenti della falda (fontanili, cave di materiali litoidi, specchi lacustri in equilibrio con le acque sotterranee, etc...) costituisce pertanto un rischio rilevantissimo di potenziale inquinamento.

La valutazione della vulnerabilità naturale e dei fattori antropici di rischio può essere effettuata per vaste aree attraverso metodologie, già in uso in molti Paesi europei e nord-americani: le Carte di vulnerabilità.

Una carta di vulnerabilità rappresenta uno scenario statico dei rischi ambientali per la previsione e prevenzione del degrado qualitativo degli acquiferi. Essa ha come obiettivi:

- fornire una zonazione di una determinata area, che indichi la possibilità di infiltrazione e diffusione di un inquinante in un acquifero;
- correlare questi dati con la presenza nell'aria di fonti puntuali o diffuse di possibile inquinamento;

- operare una valutazione dell'impatto sulla qualità delle acque sotterranee per la prevenzione di eventi catastrofici o per la riduzione dei loro effetti;
- definire gli obiettivi della prevenzione e protezione nella pianificazione dell'uso delle risorse idriche;
- organizzare il monitoraggio di qualità delle acque e dell'ambiente;
- definire il quadro di riferimento in caso di emergenze idriche.

Il primo tentativo di produrre una cartografia di vulnerabilità si deve al Department de Idrogeologie del Bureau de Recherches Geologiques et Minieres (B.R.G.M.) francese durante gli anni '70. Albinet e Margat proposero cartografie a varie scale.

Il tentativo più sistematico di definizione del problema fu proposto dall'U.S.EPA e prese il nome di DRASTIC, dall'acronimo delle iniziali dei fattori presi in esame per la definizione della vulnerabilità (tab. 1).

Tab. 1 FATTORI CHE INFLUENZANO LA VULNERABILITA' DI UN ACQUIFERO NEL METODO DRASTIC

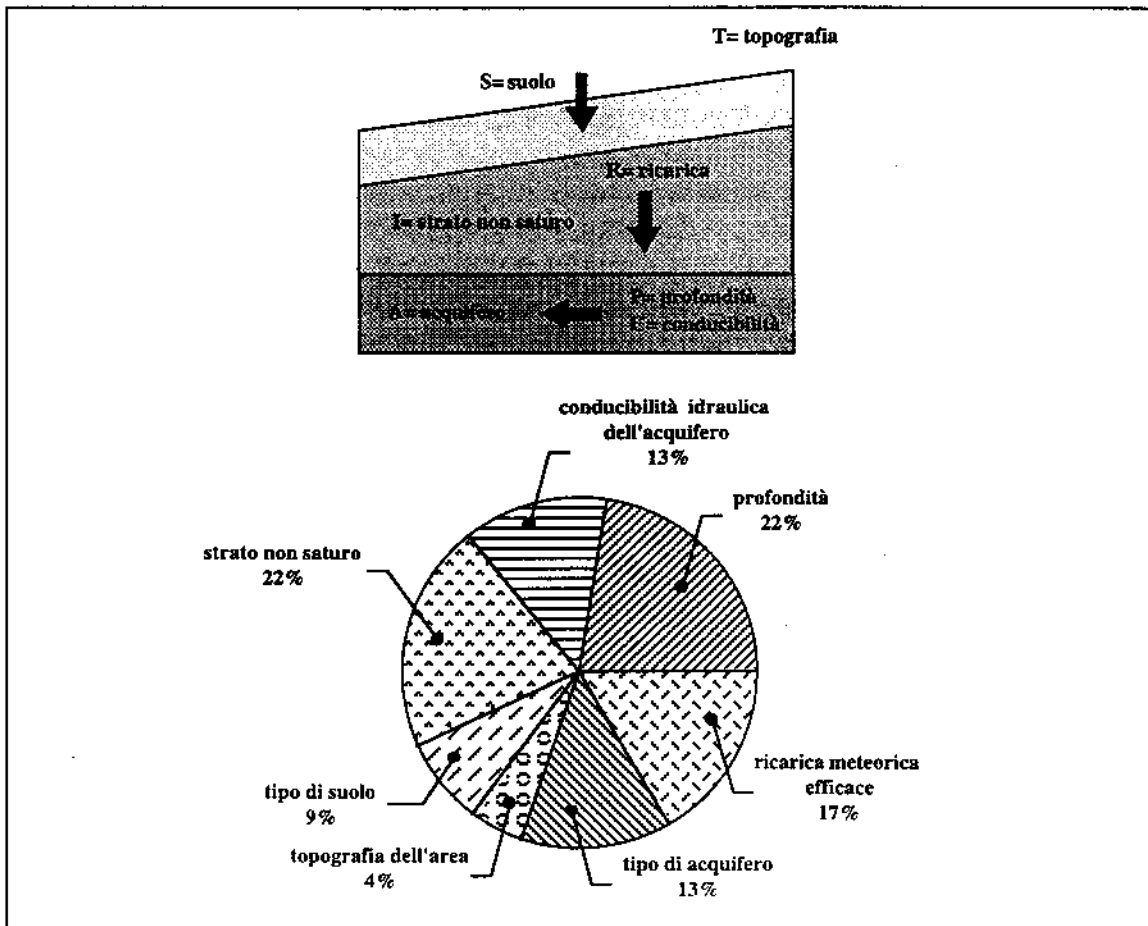


Tabella DRASTIC

Peso	
Depth (profondità della tavola d'acqua)	5
Recharge (ricarica meteorica efficace)	4
Acquifer (tipo di acquifero)	3
Soil acquifer (tipo di suolo)	2
Topography (topografia dell'area)	1
Impact (strato non saturo)	5
Conductivity (conducibilità idraulica dell'acquifero)	3

Il metodo era stato messo a punto per valutare l'ubicazione dei siti di discariche controllate di rifiuti.

Il metodo assume che:

- l'agente inquinante è disperso sulla superficie del suolo;
- l'agente inquinante è lisciviato dalla pioggia;
- l'agente inquinante possiede la stessa mobilità dell'acqua;
- l'area valutata deve superare i 100 acri.

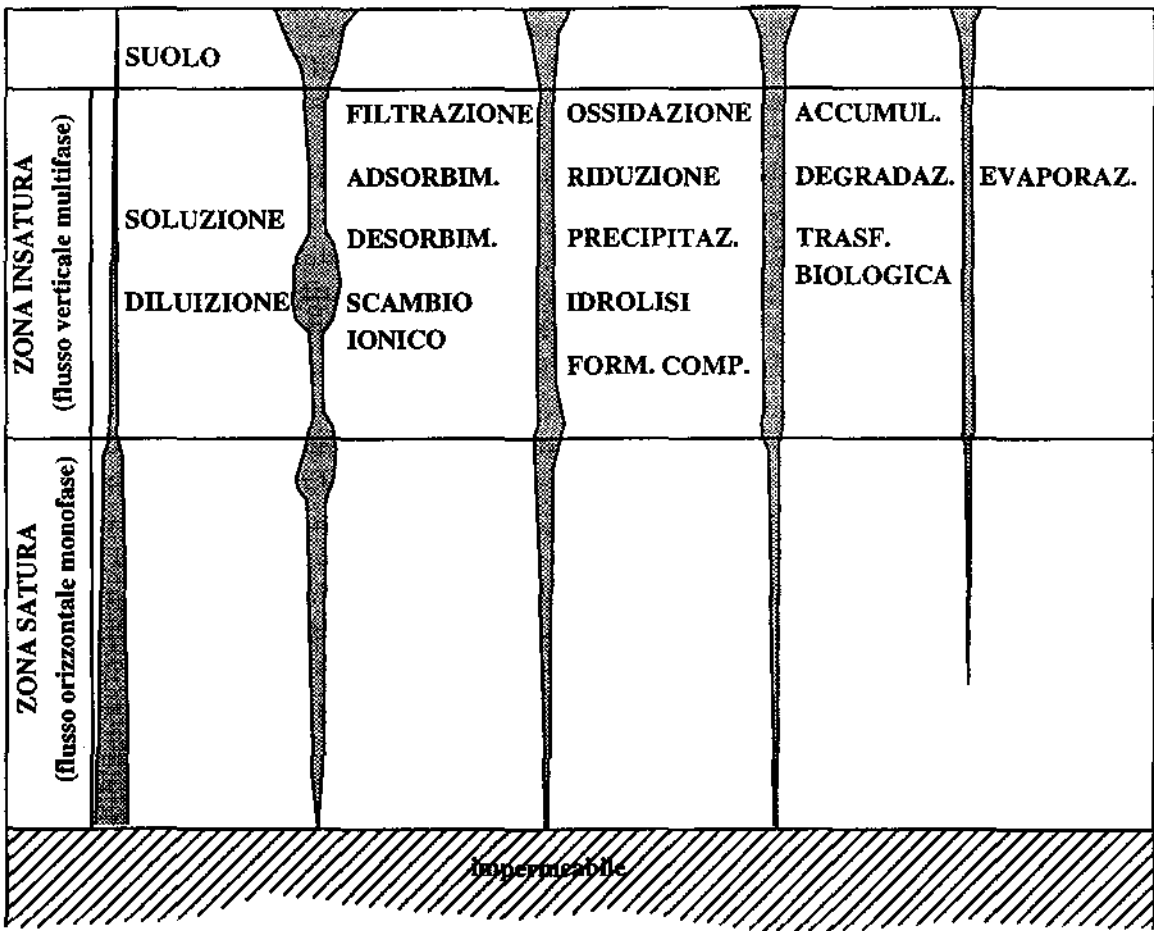
Con questo metodo può essere valutata la vulnerabilità di diversi siti, dando pesi diversi ai diversi fattori in relazione all'importanza attribuita ad essi (fig. 1).

L'indice DRASTIC si ottiene sommando vari pesi (P), ciascuno moltiplicato per l'intensità (I) del fattore:

$$IDR = \sum_{J=1}^7 I_j \cdot P_j \text{ (v. tab. 1)}$$

Altri metodi sono stati messi a punto ma in molti casi risultano di difficile applicazione per la carenza dei dati disponibili, la cui raccolta richiederebbe studi lunghi e costosi, mentre spesso è di maggiore efficacia la redazione rapida di una cartografia semplificata, ma immediatamente utilizzabile per gli scopi indicati.

Nell'esperienza italiana questo obiettivo è stato realizzato con la predisposizione di una Legenda Unificata (fig. 2A e 2B). La legenda fornisce le caratteristiche degli acquiferi corrispondenti a vari gradi di vulnerabilità (6 classi, da estremamente elevata a estremamente bassa). Ciascun tipo di acquifero è rappresentato da una gradazione cromatica sulla carta, nella quale sono riportati anche: geometria, idrodinamica e condizioni di inquinamento reale delle falde, fonti potenziali e reali di inquinamento, preventori e/o riduttori di inquinamento, principali oggetti di inquinamento (pozzi, sorgenti, etc...) con una simbologia caratteristica.



REAZIONI GEOCHIMICHE: soluzione - precipitazione
 reazione acido-base
 ossidazione - riduzione
 complessazione
 adsorbimento - desorbimento

PROCESSI FISICI: avvezione - dispersione
 filtrazione
 evaporazione
 decadimento radioattivo
 trasporto gas

PROCESSI BIOLOGICI: decomposizione sostanze organiche
 traspirazione
 movimenti attivi di batteri
 adesione batterica

Fig. 1 REAZIONI GEOCHIMICHE, PROCESSI FISICI E BIOLOGICI NEL SUOLO E NEL SOTTOSUOLO



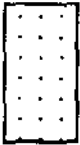
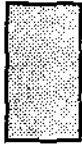
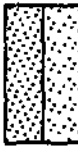

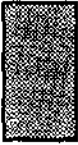

GRADO DI VULNERABILITA'						EE Estremamente elevato M Medio E Elevato B Basso A Alto BB Bassissimo o nullo
EE	E	A	M	B	BB	CARATTERISTICHE DEGLI ACQUIFERI
						Falda libera in materiali alluvionali (da grossolani a medi) senza alcuna protezione.
						Falda libera in materiali alluvionali con: a) corsi d'acqua sospesi rispetto alla piezometrica media della falda (alimentazione naturale); b) campi-pozzi deprimenti la piezometrica al di sotto del livello dei corsi d'acqua (realimentazione indotta).
						Falda o rete acquifera, in pressione, semi-libera o libera, protetta in superficie da una copertura poco permeabile.
						Rete acquifera in materiali carbonatici a carsismo completo ed altamente sviluppato (holokarst ad elevato i.c.).
						Rete acquifera in calcari fessurati, ma con i.c. basso o nullo: a) con piezometrica media poco profonda (<50 mt) rispetto al p.c.; b) con piezometrica media profonda (>50 mt) rispetto al p.c.
						Rete acquifera in dolomie fessurate e poco carsificate: a) con piezometrica media poco profonda (<50 mt) rispetto al p.c.; b) con piezometrica media profonda (>50 mt) rispetto al p.c.
						Falda acquifera in sabbie più o meno fini.
						Rete acquifera in arenarie più o meno fessurate ed in conglomerati a cemento non carbonatico.

Fig. 2A LEGENDA UNIFICATA PER LA VULNERABILITA' DEGLI ACQUIFERI




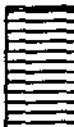

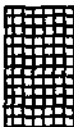

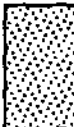

GRADO DI VULNERABILITA'						EE Estremamente elevato	M Medio
						E Elevato	B Basso
						A Alto	BB Bassissimo o nullo
EE	E	A	M	B	BB	CARATTERISTICHE DEGLI ACQUIFERI	
							Rete acquifera in rocce ignee intrusive normalmente fessurate.
							Rete acquifera e/o corpi idrici multifalda (alternanze o flysch arenacei e calcarei) con propagazione variabile da membro a membro.
							Rete e falda acquifera in vulcaniti (basalti, trachiti, ecc) ed in rocce ignee intrusive molto tettonizzate.
							Complessi marnosi ed argillosi (flysch, argille sovraconsolidate) praticamente privi di circolazione idrica sotterranea (l'inquinamento raggiunge direttamente le acque superficiali).
							Falda idrica in materiali morenici con: a) materiali prevalentemente grossolani; b) materiali prevalentemente fini.
							Complessi sedimentari a grana fine (argille, limi, torbe, ecc.) praticamente privi di circolazione idrica sotterranea (l'inquinamento raggiunge direttamente le acque superficiali).
							Complessi idrici multifalda in piroclastiti sciolte; propagazione di un inquinante variabile da membro a seconda della granulometria.
							Complessi sedimentari metamorfosati e/o tettonizzati (argille varicolori), complessi metamorfici di epizona (filladi) privi di circolazione idrica sotterranea (inquinamento limitato alle acque superficiali).
							Circolazione idrica nelle fratture delle rocce metamorfiche di meso-catazona.

Fig. 2B LEGENDA UNIFICATA PER LA VULNERABILITA' DEGLI ACQUIFERI

La legenda fu redatta tenendo conto delle possibili situazioni geoidrologiche italiane, per una rappresentazione a scala 1:50.000. Una legenda di maggior dettaglio (scala 1:25.000) ed usata anche a scala superiore (1: 100.000), che descrivesse aree alluvionali della Pianura Padana (uno dei maggiori acquiferi europei) fu predisposta tenendo conto di una maggiore disponibilità di dati esistente localmente. Tentativi di applicare questi metodi e del DRASTIC alla stessa area hanno fornito ottime coerenze.

Altri tentativi furono effettuati per realizzare, su base altimetrica e morfologica, una perimetrazione preliminare delle possibili aree di alimentazione di sorgenti nell'Appennino settentrionale.

Una recente applicazione all'analisi previsionale di un territorio, oggetto di un progettato tratto autostradale, ha consentito di individuare un corridoio a rischio minimo di impatto, in un tessuto già fortemente urbanizzato. Si è infatti passati, attraverso un semplice modello di calcolo, alla valutazione del rischio di degrado qualitativo, tenendo conto di indici di qualità delle acque sotterranee, della conducibilità idraulica dell'acquifero (e quindi della potenzialità idrica), della quota topografica assoluta (maggiore è la quota, maggiore è l'area a valle soggetta a rischio) e delle attuali fonti inquinanti potenziali, parametrate in funzione della dimensione e della tipologia produttiva.

Le Carte di Vulnerabilità rappresentano dunque un documento previsionale particolarmente utile sia in sede di pianificazione dell'utilizzo delle risorse e risanamento del territorio, per la protezione delle acque sotterranee, sia operativa, nel caso di incidenti. La sua compilazione comporta l'arricchimento e la sistemazione di un numero elevato di informazioni che spesso giacciono inutilizzate presso Enti ed Istituzioni, che ne sarebbero i potenziali fruitori ottimali.

Nel 1989 nella provincia di Modena fu evitato un possibile disastro idrogeologico con la contaminazione di un importante acquifero, impedendo che oltre 120.000 corpi di suini, abbattuti a causa di una epidemia di afta epizootica che colpì la provincia, fossero sotterrati localmente, come avviene normalmente per piccoli quantitativi nelle zone agricole. L'evidenza del rischio mostrata alle autorità con la carta di vulnerabilità fu tale da imporre soluzioni alternative.

1.3. Il monitoraggio quali-quantitativo degli acquiferi

Nonostante la sua notevole importanza intrinseca, la cartografia di vulnerabilità definisce uno scenario statico, che frequentemente non descrive compiutamente i processi dinamici del sottosuolo, nel quale si hanno trasferimenti anche a grande distanza in tempi più o meno lunghi, di volumi idrici. Per questo è indispensabile integrare le conoscenze attraverso il monitoraggio quali-quantitativo delle falde, con l'istituzione di reti di pozzi, la raccolta periodica di campioni d'acqua da analizzare, la misura piezometrica, la successiva elaborazione spazio-temporale dei dati e la loro interpretazione. Anche da parametri anche non connessi con fenomeni inquinanti, possono essere tratte indicazioni sulla idrodinamica negli acquiferi e sulle modalità di alimentazione, da integrare con le cartografie sopra descritte.

Le alterazioni del segnale idrochimico, sia dei parametri di base (Ca, Mg, Na, K, CO₃, HCO₃, SO₄, Cl, NO₃), di quelli chimico-fisici (pH, temperatura, conducibilità el. spec., potenziale redo x), di quelli che indicano condizioni particolari dell'acquifero (NH₄, NO₂, Fe, Mn), di microelementi più o meno correlabili a inquinamenti (Pb, Zn, Cu, Cd, Cr, Ni, As...) o veri e propri indici di contaminazione antropica certa (fitofarmini e loro metaboliti, solventi organici clorurati e non, etc ...) sono essenziali per l'identificazione e la comprensione dei processi degenerativi, l'allertamento dei presidi a tutela delle captazioni idriche ed i relativi interventi di risanamento e controllo.

Lo studio della microbiologia degli acquiferi è assai importante per la interpretazione della presenza di molti parametri chimici (ferrobatteri, nitrobatteri, solfatoriducenti, etc ...), mentre gli indici di contaminazione classica devono essere tenuti in massimo conto nella valutazione della potabilità delle acque, de'll' idoneità delle opere di captazione e delle condizioni prossime o remote di dispersione biologica.

Nello studio degli acquiferi, le conoscenze di tipo geoidrogeologico sono ovviamente fondamentali, in quanto l'evoluzione dei fenomeni inquinanti e la stessa idrochimica di base risente della tipologia dell'acquifero stesso (rocce porose permeabili, rocce fessurate o carsiche), nel quale i movimenti dell'acqua sono fortemente diversificati.

Più ancora per le acque superficiali sono importanti le caratteristiche chimico-fisiche degli inquinanti, in particolare la loro solubilità in acqua e la loro reattività con la matrice solida. Spesso il trasferimento dell'acqua nel sottosuolo avviene in tempi molto lunghi, tali da consentire, ad esempio, la stratificazione di più fasi a densità diversa (es.: acque dolci surriscaldanti ad acque salate, con la formazione di una netta interfaccia).

Una rete di punti di controllo, così come le successive operazioni di campionamento e relativa periodicità è basata sulla finalità che tale controllo si prefigge. Essa può avere almeno tre obiettivi:

- controllo dello stato di qualità di un acquifero o di un complesso di acquiferi, sui quali possono insistere fonti inquinanti puntuali o diffuse, che hanno la possibilità di ingenerare modificazioni temporalmente limitate o a lungo termine delle caratteristiche idrochimiche;
- prevenzione e detezione di eventuali inquinanti in arrivo alla area di protezione locale dei punti di captazione delle acque sotterranee a fini potabili;
- allarme in tempo reale per la presenza di inquinanti o di caratteristiche indesiderate nei pozzi di captazione.

1.3.1. Controllo dello stato di qualità di un acquifero. - La scelta dei punti di osservazione da campionare costituisce la fase più delicata dell'intera procedura di controllo. Essa non dovrà avvenire in modo occasionale, ma dovrà essere basata su precise acquisizioni preliminari sull'intero sistema acquifero da sottoporre a monitoraggio. In particolare di esso dovranno essere noti molti dei parametri utilizzati per la redazione delle carte di vulnerabilità:

- geologia e geomorfologia;
- idrogeologia del territorio interessato, con particolare riguardo a: permeabilità superficiale, stratigrafia, parametri idrodinamici degli acquiferi etc.;
- idrografia superficiale e portate;
- censimento dei pozzi e delle sorgenti e loro caratteristiche costruttive e d'uso;
- definizione di particolari emergenze naturalistiche o di sorgenti potenziali minerali o termominerali;
- censimento delle sorgenti potenziali di inquinamento e delle modificazioni territoriali indotte.(es.: cave, modifiche; alvei fluviali, etc...);
- caratterizzazione idrochimica di massima delle acque sotterranee; serie storiche dei dati idrochimici e loro distribuzione areale.

Il livello di affinamento di questi ultimi dati può essere molto variabile e verrà arricchito attraverso le reti di monitoraggio. Tutti questi dati devono essere riportati su carte tematiche di base, secondo le metodologie correnti.

Si segnala la particolare rilevanza che possono assumere i grandi centri di prelievo di acque sotterranee (acquedotti, industrie, frigoriferi industriali etc...), che possono modificare sensibilmente l'idrodinamica sotterranea, inducendo flussi preferenziali e quindi modificazioni della distribuzione areale dei valori dei parametri idrochimici naturali o di derivazione antropica.

Sulla base di queste conoscenze può essere individuata una rete ottimale, che per acquiferi alluvionali normalmente è costituita da 1-2 pozzi per km quadrato.

In ragione dei diversi tipi di acquifero da controllare o delle diverse modalità di alimentazione e circolazione idrica, in alcuni casi si, possono prevedere più reti di pozzi sovrapposte, ognuna delle quali individuata per controllare, ad esempio, un diverso livello acquifero e quindi ciascun pozzo deve consentire il campionamento solamente di questo livello. La casistica appare molto ampia e, data anche la concomitante esigenza di controllo di forti inquinanti, la scelta deve essere operata caso per caso sulla base delle conoscenze acquisite e sopra ricordate.

Per evitare di dover mettere sotto controllo un numero esorbitante di pozzi, in caso di diversi orizzonti acquiferi, si può ricorrere ad una semplificazione scegliendo una sola rete di opportuna densità per il livello più superficiale (e quindi più esposto al rischio di inquinamenti), escludendo, eventualmente, i pozzi a bassissima profondità di più antica escavazione in quanto facilmente inquinabili localmente, quindi non rappresentativi (pozzi a camicia di grande diametro, che peraltro sono spesso pericolosi veicoli di inquinamento che vanno pertanto individuati).

In aree dove fossero individuati inquinamenti, anche attraverso studi di dettaglio, alcuni dei pozzi utilizzati, potranno entrare nella rete di controllo per seguire nel tempo il fenomeno, che andrà evidentemente raffittita localmente.

I pozzi che andranno a costituire la rete dovranno rispondere ai seguenti requisiti:

accessibilità: il pozzo deve essere facilmente raggiungibile ed il campionamento

comportare il minimo impegno temporale possibile;

riproducibilità: il pozzo e le opere annesse non devono influenzare la qualità delle acque campionate, ma costituire un elemento di trasporto "inerte"; devono pertanto essere evitati i campionamenti a valle di cisterne o autoclavi che possono modificare alcuni parametri chimici e microbiologici;

significatività: il pozzo deve rappresentare, con sufficiente approssimazione, le caratteristiche dell'acquifero sotteso alla subarea su cui è centrato.

1.3.2. Rete di salvaguardia di captazioni idropotabili. - Alcuni dei pozzi della 1° rete di controllo della qualità dell'acquifero possono essere scelti nelle immediate vicinanze dei limiti delle fasce di rispetto ed andare a costituire una rete finalizzata alla prevenzione e detezione di eventuali inquinanti in arrivo. Ovviamente per il perseguimento di questi obiettivi tale rete dovrà presentare una densità ben superiore a quella della rete generale. Si dovrà perciò integrare con altri pozzi. In questo caso la distribuzione areale e la profondità dei livelli acquiferi captati avrà una notevole importanza, per un efficace raggiungimento dell'obiettivo. Proprio per questo motivo, non sarà sempre possibile utilizzare pozzi già esistenti, ma si imporrà lo scavo di idonei piezometri, da utilizzare per misure idrodinamiche e per i controlli qualitativi, sia dei livelli acquiferi captati da pozzi, sia di quelli non captati, i quali potrebbero inquinarsi e consentire il successivo trasferimento al livello captato.

1.3.3. Allarme in tempo reale. - Dovrà essere possibile con l'attrezzatura del pozzo di captazione mediante sonde di misura in continuo di uno o più caratteristiche idrochimiche salienti.

1.3.4. Strategia di campionamento. - Ciascuno dei casi sopra descritti prevede una strategia di campionamento e relative analisi con peculiarità specifiche pur nell'ambito di modalità generali. Per quanto ottiene la periodicità di campionamento delle reti di controllo, essa è strettamente connessa al tipo di acquifero da tenere sotto controllo. In generale è bene che essa sia sufficientemente ravvicinata per evitare che inquinamenti istantanei ed occasionali si possano propagare tra due successivi prelievi. Non si dovrà tuttavia eccedere con frequenze troppo ravvicinate per non sovraccaricare la struttura analitica, ottenendo tra l'altro un numero eccessivo di dati analitici ripetitivi e perciò del tutto inutili. Di solito si propende per due prelevamenti annuali in corrispondenza della minima e della massima quota freatica o piezometrica (o portata nel caso di sorgenti) del livello acquifero interessato, che dovrà sempre essere determinata al momento del prelievo.

Su alcuni pozzi della rete a grande scala potranno essere previsti prelievi più frequenti da destinare alla determinazione di pochi parametri-guida, in aree a rischio (ad es.: un pozzo a valle di una fonte potenziale di inquinamento dalle caratteristiche note). Sui pozzi scelti a protezione delle aree di protezione si dovranno prevedere campiona-

menti corrispondenti al tempo teorico di arrivo di un inquinante dal limite dell'area all'opera di captazione che si vuole proteggere.

L'allarme in tempo reale alle opere di captazione potrà essere realizzato con sensori automatici di misura di alcuni parametri di semplice determinazione e sufficientemente indicativi dei possibili inquinanti in arrivo. Per un controllo complessivo è sufficiente la misura della conducibilità elettrica specifica (che controlla tutto il *pool* di inquinanti inorganici) e del TOC (o carbonio organico totale, che rappresenta la misura del *pool* di possibili inquinanti organici). E' chiaro che questa protezione è inefficace contro micro quantità di singoli inquinanti, anche tossici, che dovranno essere ricercati sia in funzione delle potenziali fonti inquinanti individuate, con periodici controlli ad ampio aspetto analitico sulle opere di captazione.

1.3 5. Esempio della rete di monitoraggio regionale e locale in Emilia Romagna (Italia). - La regione Emilia Romagna costituisce la parte meridionale della Pianura Padana a sud del fiume Po, a ridosso del rilievo appenninico, fino al Mar Adriatico. Essa è quindi parte del grande acquifero padano e ne sintetizza alcune caratteristiche.

A titolo esemplificativo esaminiamo i risultati ottenuti dal monitoraggio della qualità delle acque sotterranee, realizzato attraverso un'apposita rete di 500 pozzi messa a punto dalla Regione e gestita analiticamente da organi tecnici sanitari e ambientali locali.

Una sezione in fig. 3 è ricostruita, lungo un allineamento S-N dal margine collinare al fiume Po schematizza stratigraficamente l'area. Il rilievo appenninico, al suo approfondirsi al di sotto della superficie della pianura, costituisce il basamento pliocenico dell'acquifero alluvionale, dovuto ai materiali trasportati dai fiumi e sedimentati selettivamente, da quelli più grossolani al loro sbocco dal solco vallico, via via a quelli sempre più fini verso nord, dove nella media pianura prevalgono stratigraficamente le argille, per lasciare il posto ai sedimenti sabbioso-ghiaiosi del fiume Po e degli affluenti alpini, che dominano tutta la media Padania.

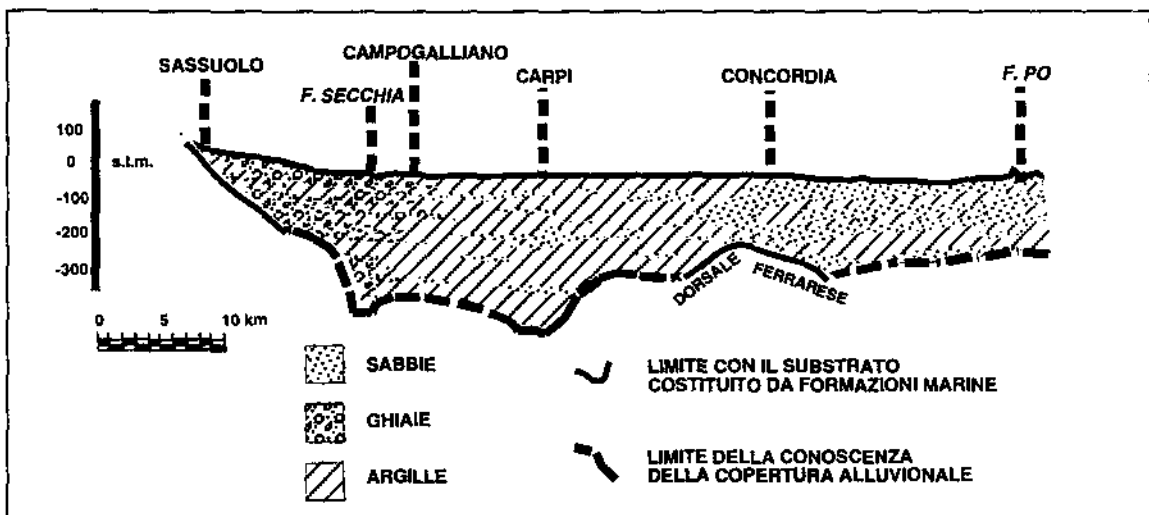


Fig. 3 PROFILU GEOLOGICO SEMPLIFICANTE LA SITUAZIONE STRUTTURALE DEL SOTTOSUOLO (PER LA SOLA COPERTURA ALLUVIONALE)

Nella parte prossima al rilievo appenninico l'acquifero affiora e trae alimentazione sia dalla dispersione diretta dalla superficie topografica, sia dagli alvei fluviali.

L'analisi spaziale della distribuzione della concentrazione di alcuni parametri chimici fornisce utili indicazioni sulla alimentazione e su fenomeni degenerativi.

I dati sono raccolti semestralmente, assieme alle misure piezometriche, in corrispondenza della minima e massima escursione della falda (novembre - aprile).

I Cloruri (fig. 4) delimitano chiaramente aree nelle quali esistono anomalie idrochimiche, dovute: alla dispersione di acque superficiali ad elevato contenuto alogenico di origine evaporitica appenninica (T. Taro, F. Secchia, F. Bidente), a salienza delle acque salate di fondo della anticlinale sepolta, nota come "Dorsale Ferrarese" (prov. di Ferrara, Modena e Reggio Emilia), a ingressione marina (Rimini, Ravenna) per sovrasfruttamento degli acquiferi.

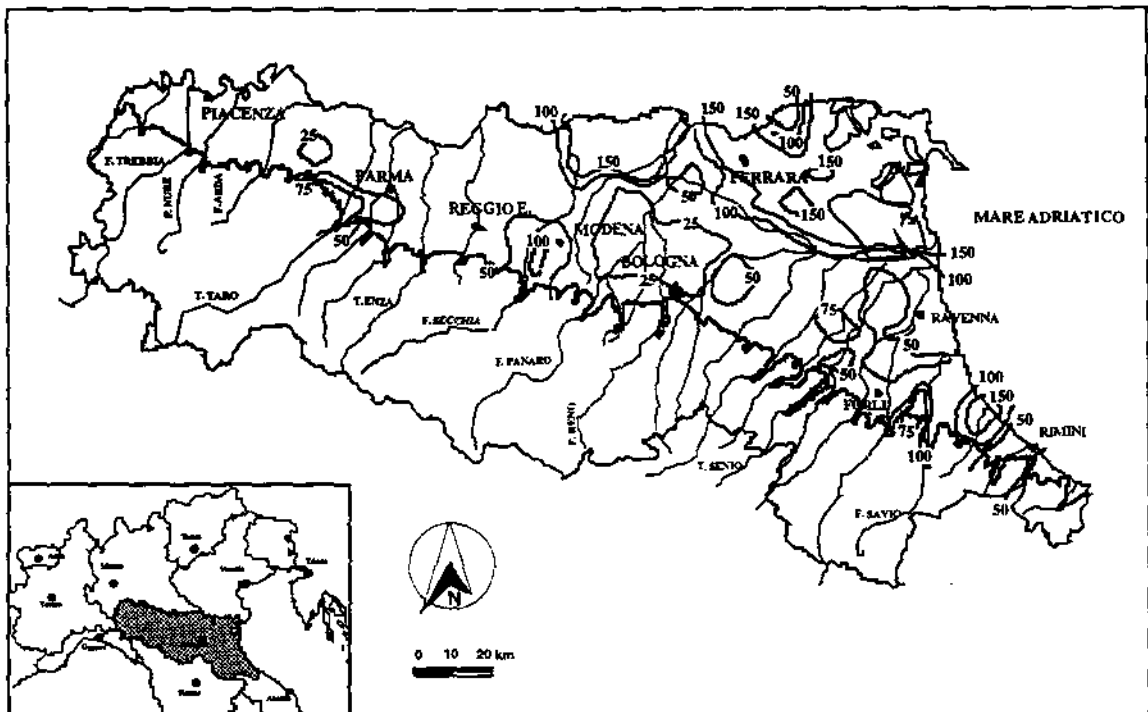


Fig. 4 ACQUE SOTTERRANEE NELLA REGIONE EMILIA ROMAGNA: DISTRIBUZIONE AREALE DEI CLORURI (isovalori in mg/l).

I Solfati, (fig. 5) presenti quasi solo nella fascia pedecollinare, hanno origini simili (evaporati), mentre fenomeni biochimici favorevoli dalla riduzione delle specie ioniche ossidate ($Eh \leq 0$; batteri solfato-riducenti, ferro-batteri, etc...) ne provocano la scomparsa oltre l'allineamento, della Via Emilia, sul tracciato della antica strada consolare romana che congiunge i capoluoghi e che segna la transizione tra gli acquiferi di alta pianura a maggiore trasmissività e tasso di rinnovamento a quelli della media e bassa, dove invece compaiono le specie ridotte, quali Ferro, Manganese e, soprattutto,

Ammoniaca (fig. 6) la cui presenza domina tutta la restante pianura. si tratta, in questo caso, di Azoto di provenienza organica remota, in acquiferi in moto lentissimo. Nel Ravennate le acque tra 200 e 400 m di profondità sono state datate ad oltre 50.000 anni con la tecnica degli isotopi radioattivi naturali.

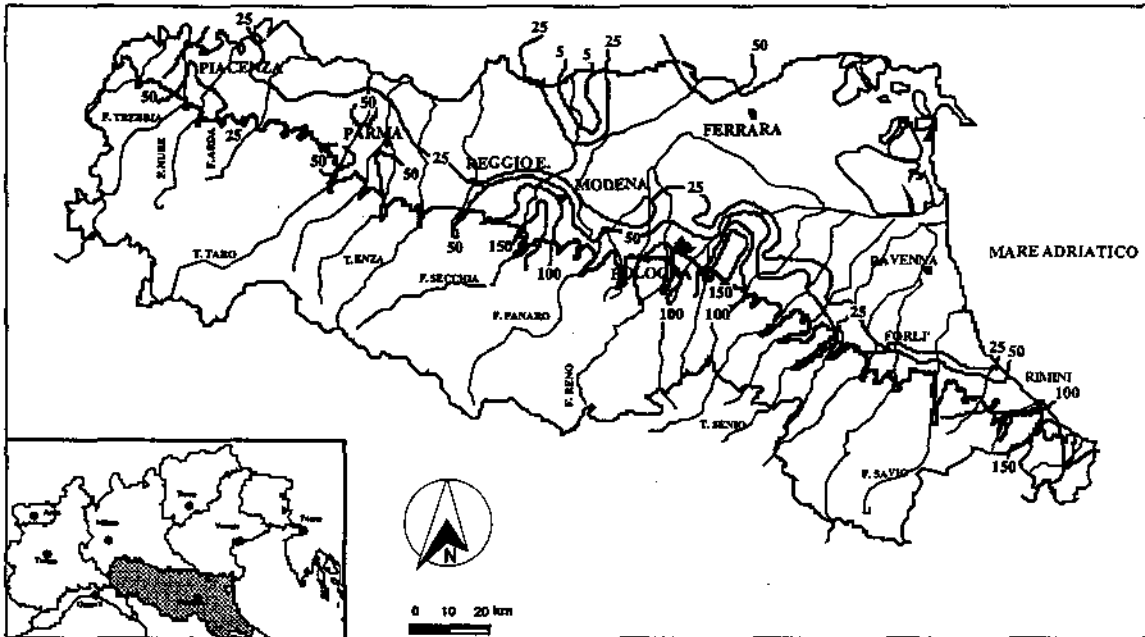


Fig. 5 ACQUE SOTTERRANEE NELLA REGIONE EMILIA ROMAGNA: DISTRIBUZIONE AREALE DEI SOLFATI (isovalori in mg/l).

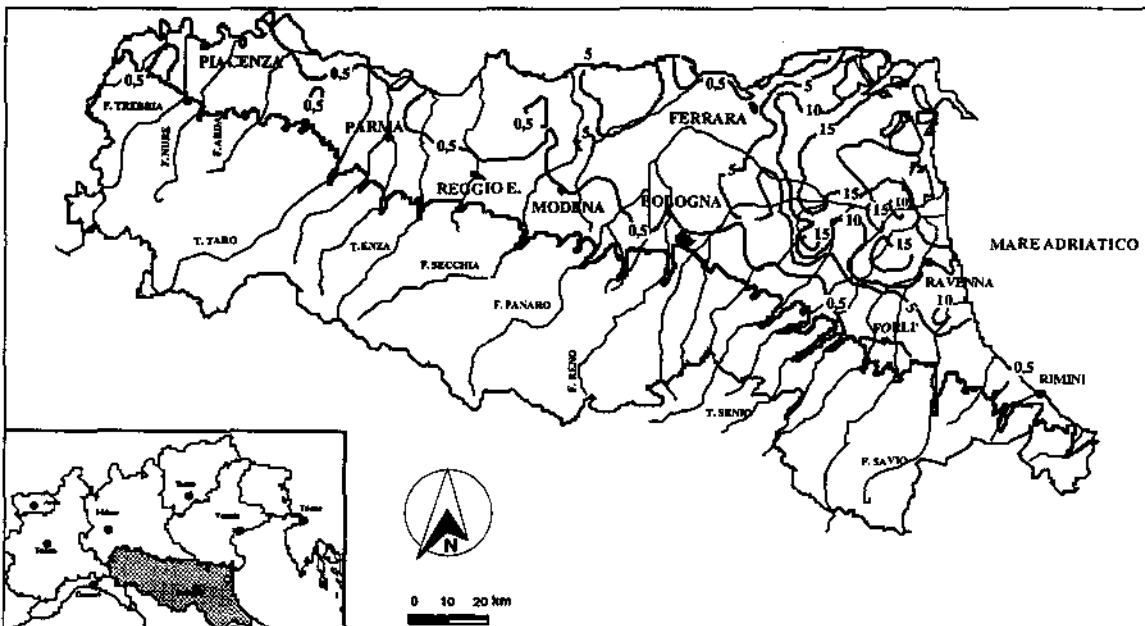


Fig. 6 ACQUE SOTTERRANEE NELLA REGIONE EMILIA ROMAGNA: DISTRIBUZIONE AREALE DELL'AMMONIACA (isovalori in mg/l).

Mentre la specie ossidata (Nitrati) domina pressoché tutta la fascia pedecollinare. In questi acquiferi, fino almeno agli anni '50 erano attivi numerosi fontanili, allineati lungo la Via Emilia, nella fascia di transizione tra acquiferi freatici o a debole grado di artesianesimo e- quelli in pressione; la portata di queste risorgive rappresentava il surplus di acqua, alimentata dalle precipitazioni e dalla dispersione fluviale e non captata. L'intenso sfruttamento e l'abbassamento degli alvei fluviali hanno portata alla loro quasi scomparsa, con abbassamenti della tavola d'acqua anche di decine di metri e la creazione di un potente spessore insaturo, nel quale l'eccesso di apporti azotati al suolo agrario (non utilizzato dalle coltivazioni, né soggetto a denitrificazione) viene immagazzinato, per essere successivamente dilavato, portando a concentrazioni di Nitrati in falda spesso oltre il limite di potabilità. Infatti l'intenso sfruttamento agronomico dei suoli e gli insediamenti zootecnici portano a carichi di azoto da concimi chimici e da liquami dispersi sulla superficie agronomica, superiori anche di un ordine di grandezza rispetto alle reali necessità.(fig. 7).

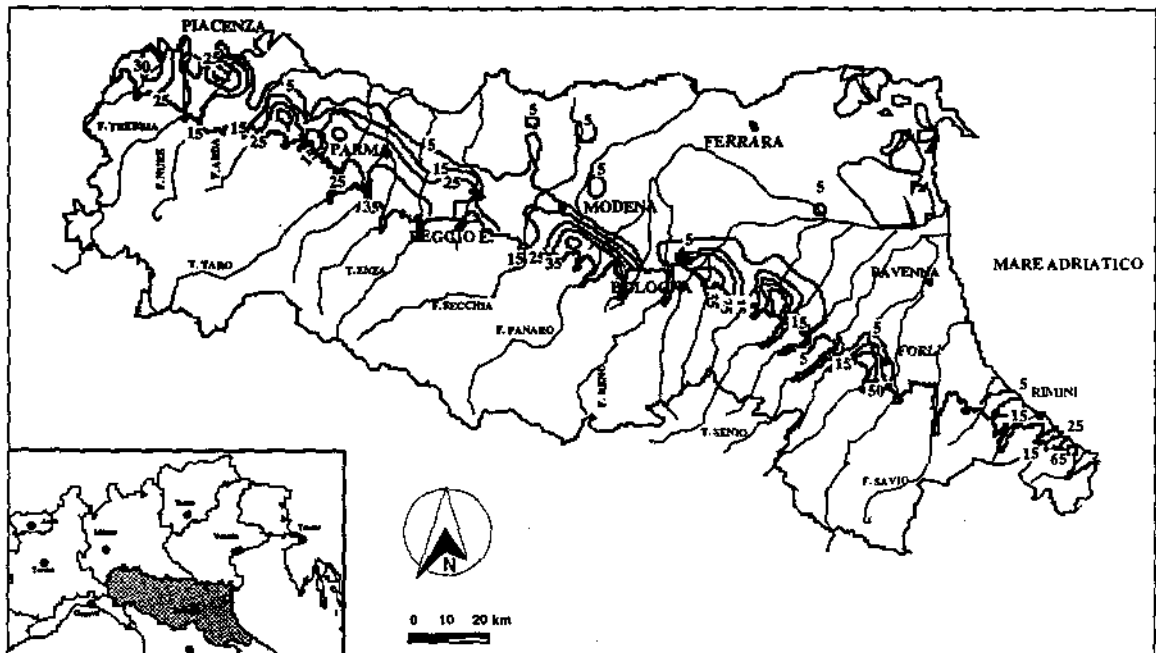


Fig. 7 ACQUE SOTTERRANEE NELLA REGIONE EMILIA ROMAGNA: DISTRIBUZIONE AREALE DEI NITRATI (isovalori in mg/l).

Nella sola alta pianura modenese è stata calcolata, una disponibilità di Azoto di provenienza zootecnica, fino al 1989, di 4200 tonnellate, ridotte alle attuali 3000 per la drastica diminuzione del numero di suini allevati. A livello italiano ed europeo il problema dei Nitrati costituisce sicuramente una pesante ipoteca alla utilizzazione delle risorse idriche sotterranee ed ha suggerito alla Commissione della CEE l'emanazione di un'apposita direttiva, che ha confermato le norme restrittive per il settore zootecnico, da tempo emanate allo scopo di ridurre l'impatto, dalla Regione Emilia Romagna.

I dati di una rete locale di 150 pozzi distribuiti su circa 300 km² nell'alta pianura modenese hanno

consentito un'analisi di dettaglio sia delle caratteristiche idrochimiche di base dell'acquifero, sia della evoluzione del contenuto di Nitrati, di cui è riportata una distribuzione areale relativa al campionamento del novembre 1992 in fig. 8.

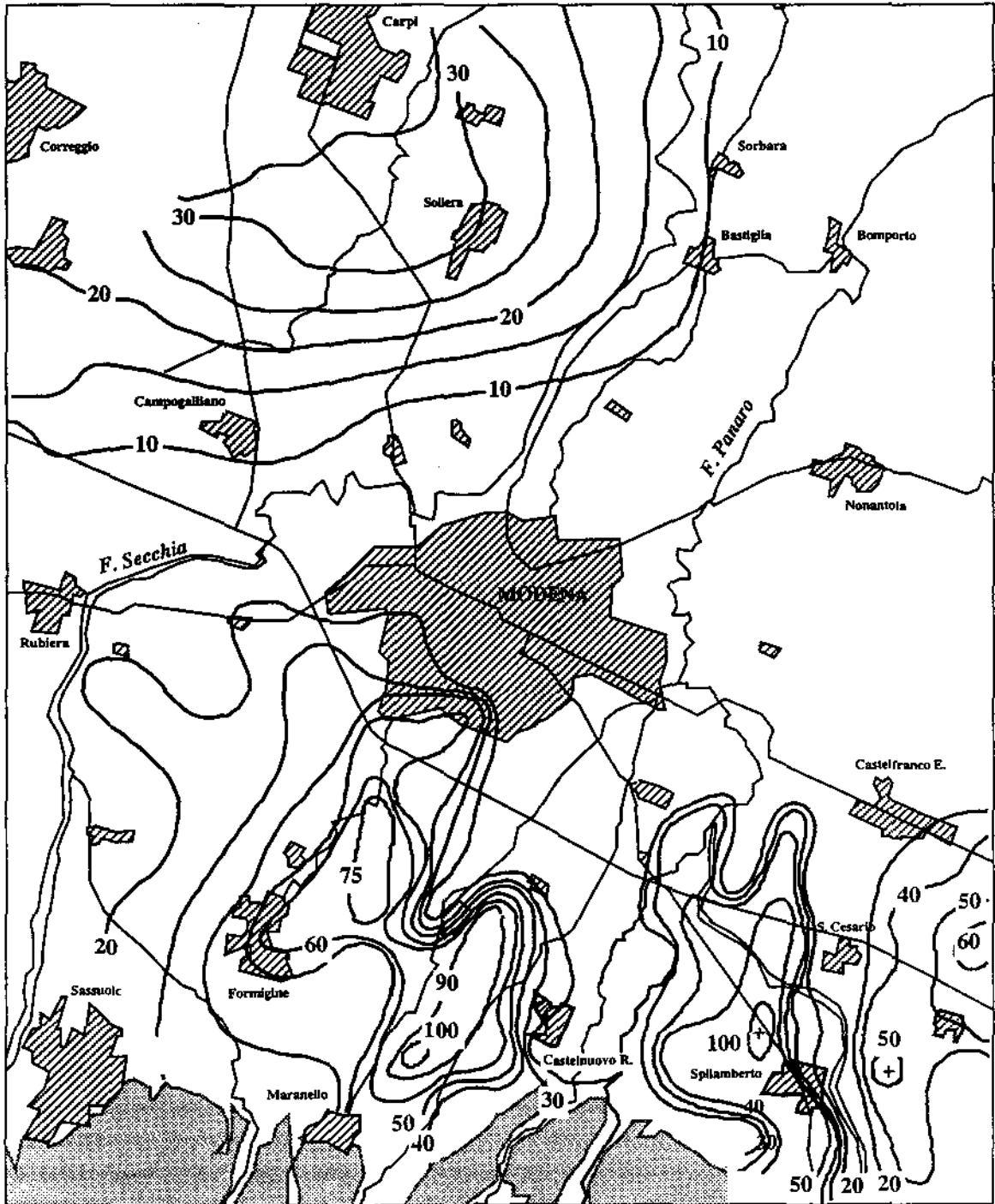


Fig. 8 CONFRONTO TRA VARIE NORMATIVE DI DEFINIZIONE DELLE AREE DI PROTEZIONE.

Lo studio di più anni (1987-1993) ha consentito di verificare che la distribuzione temporale dei valori di Nitrati è variabile in funzione della piovosità e delle condizioni di alimentazione dell'acquifero.

Per tentare una correlazione tra piovosità, piezometria e aree soggette a inquinamento si è costruita la fig. 9.

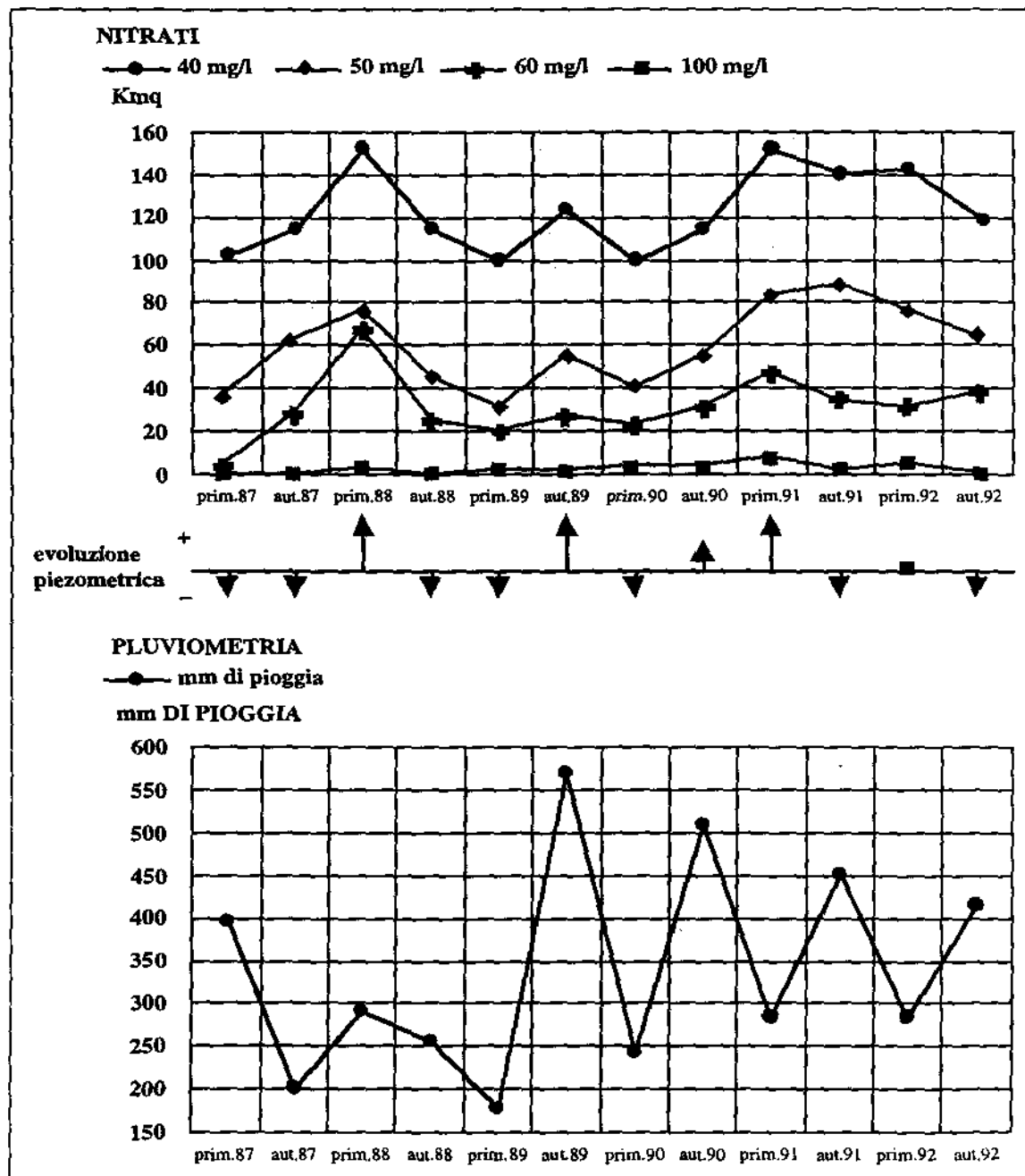


Fig. 9 CORRELAZIONE TRA PLUVIOMETRIA, PIEZOMETRIA ED AREE INTERESSATE DA ELEVATA CONCENTRAZIONE DI NITRATI

In essa sono riportate le superfici complessive in km^2 delle aree inquinate, con l'indicazione della suddivisione in sotto-aree per i vari valori di concentrazione, portandolo da 40 mg/l fino a 100 mg/l di NO_3 .

Nello stesso grafico è riportata per ciascuna campagna di misura, la piovosità complessiva del semestre precedente ed una indicazione qualitativa dell'andamento piezometrico medio nell'area.

Si può notare che dalla seconda campagna del 1987 fino a quella autunnale 1990, si ha un andamento perfettamente coerente tra piovosità e dimensione delle aree inquinate: maggiore è la precipitazione complessiva, maggiore è la superficie e viceversa.

L'andamento della piezometria è altrettanto coerente. Ciò giustifica l'attribuzione di un importante ruolo regolatore del non saturo, in cui l'Azoto viene immagazzinato e raggiunge le falde per dilavamento durante l'innalzamento dei livelli a seguito della ricarica.

Il periodo '87-'90, relativamente poco piovoso giustifica, se è vera questa ipotesi, la progressiva riduzione della superficie delle aree come sopra descritto.

Successivamente l'andamento della piovosità non risulta più coerente con quello della dimensione delle aree. Ciò è dovuto allo sfasamento della ricarica per ragioni meteorologiche, mentre la piezometria invece segue una distribuzione temporale coerente con l'andamento della dimensione delle aree a conferma della validità del modello concettuale della dispersione dei Nitrati.

1.4. Criteri per la delimitazione delle aree di tutela delle opere di captazione

Uno degli obiettivi primari delle Carte di Vulnerabilità e del monitoraggio degli acquiferi è la determinazione delle aree più sensibili, ossia di quelle nelle quali avviene l'alimentazione dei sistemi acquiferi.

In molti Paesi la legislazione ambientale ha delineato le modalità di perimetrazione di *Aree di tutela* al fine della protezione delle risorse idriche captate.

In tab. 2 sono sinteticamente riportate alcune definizioni. In linea di massima sono definite:

- *zona di rispetto assoluto*: di solito poche decine di metri quadrati attorno all'opera di presa (pozzo o sorgente), nella quale non sono ammesse altre attività ad esclusione del prelievo idrico potabile; tali aree sono recintate in sicurezza;
- *zona di rispetto*: fino a diverse migliaia di mq attorno all'opera di presa, con molte limitazioni d'uso e rigorosa regolamentazione delle attività annesse;
- *zona di protezione*: coincide con l'area di alimentazione e, attraverso la carta di vulnerabilità e il sistema di monitoraggio possono essere definiti vincoli d'uso e le cautele da adottarsi, attraverso la pianificazione territoriale.

Solo una serie di dettagli differenziano le varie normative, che tuttavia, si rifanno ad

alcuni criteri di perimetrazione:

- *criteri geometrici*: la distanza dal confine della zona è fissata in metri, in modo indipendente dalle situazioni idrogeologiche;
- *criterio idrogeologico*: dipendente dalle condizioni idrogeologiche dei vari tipi di acquifero;
- *criterio del tempo di arrivo*: di un inquinante dal limite della zona all'opera di presa. Questo tempo può essere determinato attraverso studi idrogeologici e prove di campo.

Questi criteri possono essere variamente combinati nella definizione normativa.

Tab. 2 CONFRONTO TRA VARIE NORMATIVE DI DEFINIZIONE DELLE AREE DI PROTEZIONE.

Proibizioni	GER	AUT	BEL	FIN	NDL	FRA	SVI	HUN	SWE	GBR
permesse solo attività che approssimano acqua	ZONA I campo di sorgente 10 mt	Area di protezione immediata	Zona di protezione immediata	Area di immissione ????	Campo di sorgente	Protezione immediata (10-20 mt)	Zona I (10-20 mt)	Zona di protezione	Area di sorgente	Area di protezione immediata (normalmente 10-50 mt)
proibizioni su restrizioni costruttive ed agricole	ZONA II 50 giorni	Area di protezione 50 giorni	100 mt 24 ore	Zona di protezione interna 60 giorni	Area di raccolta acqua	Area di protezione interna ????	Zona II 10 giorni ≥ 100 mt	Zona di protezione interna 50 giorni ????	Zona di protezione interna ≥ 60 giorni ≥ 100 mt	Non ci sono zone stabilite ma la protezione dell'acqua del sottosuolo avviene attraverso la pianificazione dello sviluppo e delle procedure di controllo ambientale con priorità di controllo alle aree di ricarica acquifera (le classificazioni di vulnerabilità possono essere usate come strumenti in questo processo)
			Zona di protezione interna 300-1000 mt							
restrizioni su determinate industrie, deposito e trasporto di determinati prodotti chimici e petrolio	ZONA III A	Zona di protezione parziale	Zona di protezione lontana	Zona di protezione esterna	Area di protezione con ritardo di 10 anni	Area di protezione lontana	Zona III ≥ 200 mt	Area di protezione idro-geologica	Area di protezione esterna	Protezione regionale
	2 km				Area di protezione con ritardo di 25 anni		Zona A			
	ZONA III B				Area di ricarica lontana		Zona B			

Nelle proposte tecniche di definizione delle zone, recentemente elaborate in Italia, si è cercato di prendere in considerazione le più diverse condizioni idrogeologiche e lo stato di fatto di molti acquedotti (ad esempio quelli i cui centri di prelievo sono collocati all'interno di aree urbanizzate). Sono state date, per questo, una serie di definizioni, da

applicare in sede normativa, per rendere praticabile la protezione:

Acquifero protetto: si definisce protetto un'acquifero separato dalla superficie da un corpo geologico dello spessore minimo di 10 metri che abbia o una conducibilità idraulica inferiore a 10^{-8} m/s, o che consenta un tempo di permanenza al suo interno superiore a 30 anni; la continuità areale del corpo geologico deve essere accertata per una congrua estensione.

Qualora si interpongono corpi geologici con permeabilità superiore, lo spessore da considerare sarà dato dalla somma dello spessore dei singoli corpi geologici impermeabili.

Un acquifero si intende protetto quando le indagini in sottosuolo e le prove tecniche eseguite risultano verificate per il 100%. Questa definizione permette di diminuire la superficie topografica soggetta a vincoli territoriali, che, ovviamente, costituiscono una limitazione socio-economica rilevante così come le opere di protezione.

Acquifero vulnerabile: acquifero che non presenta le caratteristiche di protezione delle acque sotterranee sopra descritte.

E' una importante conseguenza sul piano normativo, della utilizzazione delle carte di vulnerabilità, sulla cui base possono essere adottati vincoli territoriali e individuate le modalità di risanamento.

Acquifero urbano: acquifero sottostante ad aree urbanizzate e già edificate per almeno il 20% della superficie compresa nella zona di rispetto.

Questo concetto permette, di mantenere il prelievo, ma con l'obbligo di adottare nelle situazioni di prelievi idrici nei centri urbani, cautele passive (impermeabilizzazione delle potenziali superfici disperdenti; monitoraggio in continuo, piani di emergenza etc.), ove non sia possibile un trasferimento del prelievo in zone più idonee.

Protezione dinamica: è costituita dall'attivazione e gestione di un preordinato sistema di controllo e/o monitoraggio delle qualità delle acque in afflusso alle captazioni in grado di verificasse permanentemente i fondamentali parametri qualitativi e di consentire con sufficiente tempo di sicurezza l'anticipata registrazione di eventuali segni di degrado.

Protezione statica: è costituita dai divieti, vincoli e regolamentazioni che si applicano alle zone di tutela assoluta, di rispetto e di protezione finalizzati alla prevenzione del degrado qualitativo delle acque in afflusso alle captazioni.

Zona ad efficacia limitata: zona di rispetto in corrispondenza di un acquifero vulnerabile e con presenza di centri di pericolo.

Tiene conto delle situazioni di vulnerabilità al rischio così elevate, in ragione delle condizioni idrogeologiche, da rendere impossibile l'applicazione di vincoli generalizza-

ti per aree di grandi dimensioni. Si dovrà quindi arrivare ad un compromesso tra bonifica dei centri di pericolo, fino al loro allontanamento, e monitoraggio continuo della qualità, con adeguati piani di emergenza.

Zona di riserva: zona delimitata in cui il patrimonio idrico è protetto per salvaguardarne la qualità e la quantità per un possibile prelievo futuro.

Negli studi condotti per approfondire la applicabilità delle aree di tutela, sono state individuate modalità di protezione delle sorgenti: La perimetrazione delle aree in questo caso è fatta su base di un abaco relativamente semplice (fig. 10), basato sulle curve di esaurimento delle sorgenti, definendo quattro situazioni base, nelle quali vengono definiti i parametri dimensionali delle aree, così come indicati in fig. 11 e nelle tabelle 3, 4 e 5.

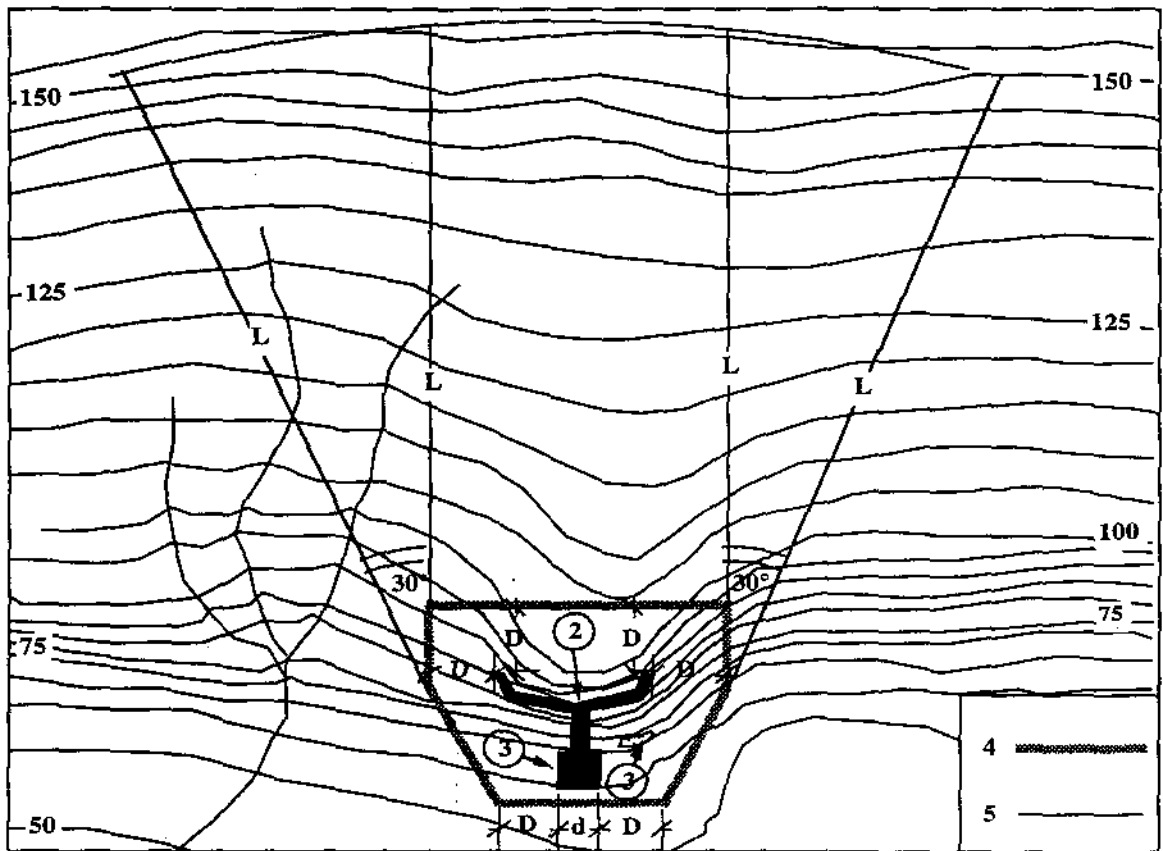


Fig. 10 DIMENSIONAMENTO DELLA ZONA DI TUTELA ASSOLUTA (ZTA) E DELLA ZONA DI RISPETTO (ZR) DI UNA SORGENTE NORMALE CAPTATA PER GALLERIA DRENANTE NELL'IPOTESI PROGETTUALE DI SITUAZIONE DI VULNERABILITA' TIPO "D".

1. = posizione della sorgente naturale prima della captazione; 2. = opera di captazione in acquifero; 3. = sistema di vasche e camera di manovra; 4. = limiti della ZTA; 5. = limiti della ZR; D. = 20 mt; d. = 4 mt; L. = 200 mt

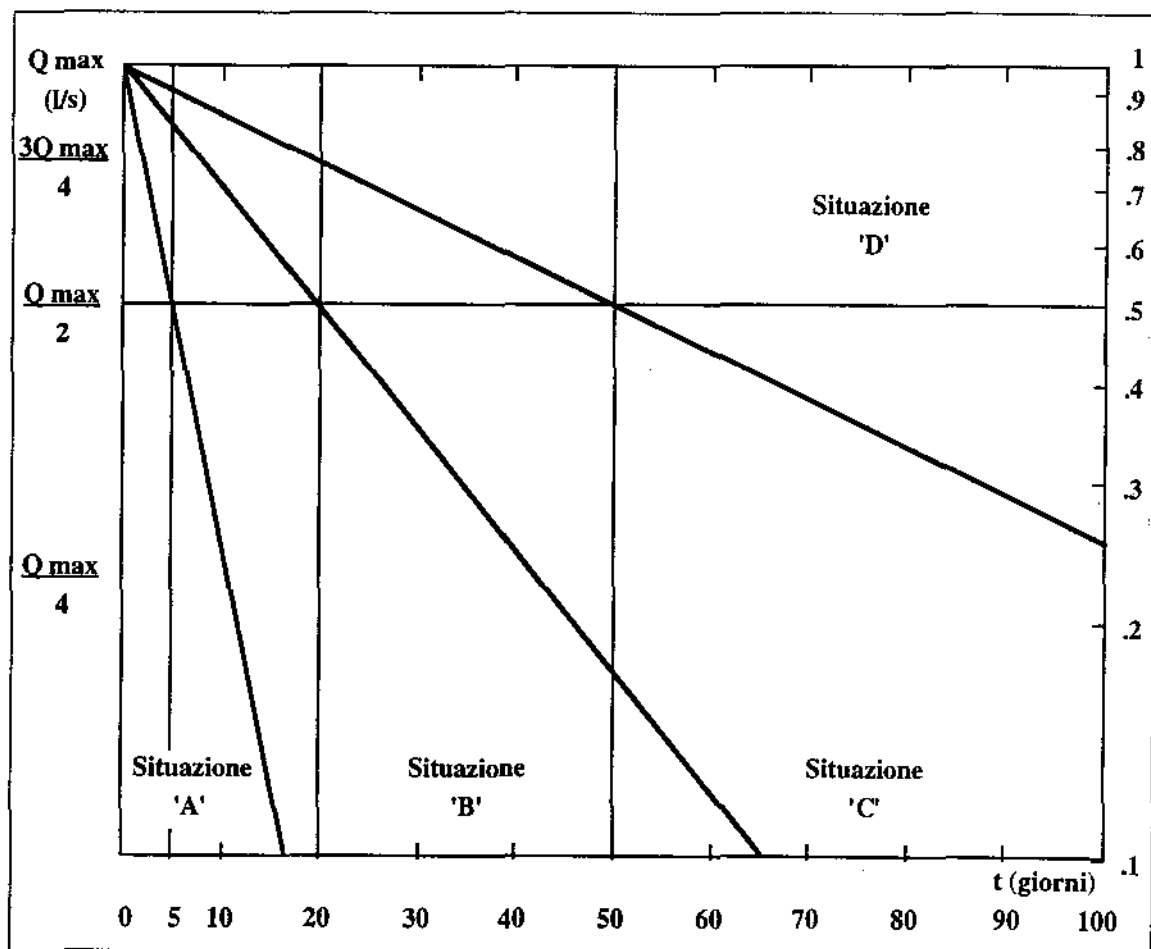


Fig. 11 ABACO PER LA DETERMINAZIONE DELLA "SITUAZIONE" DI VULNERABILITA' IN FUNZIONE DEL TEMPO DI DIMEZZAMENTO DELLA PORTATA MASSIMA ANNUALE DELLE SORGENTI NORMALI

Tab. 3 SITUAZIONI DI VULNERABILITA' DISCRIMINATE PER LA DIFFERENZIAZIONE DEL DIMENSIONAMENTO DELLE AREE DI SALVAGUARDIA DELLE SORGENTI DESTINATE AL CONSUMO UMANO

Situazione	Tempo di dimezzamento (t_D , giorni)
"A"	$t_D < 5$
"B"	$5 \leq t_D \leq 20$
"C"	$20 < t_D \leq 50$
"D"	$t_D > 50$

Tab. 4 VALORI INDICATIVI DI "D" E "d" PER IL DIMENSIONAMENTO DELLA ZONA DI TUTELA ASSOLUTA DI UNA SORGENTE NELLE DIVERSE SITUAZIONI IDRODINAMICHE

Tipo di opera	Situazione	Soggiacenza	D (mt)	d (mt)
Alla sorgente	"A"	Nulla	40	10
	"B"	Nulla	30	5
	"C"	Nulla	20	5
	"D"	Nulla	10	2
In acquifero	"A"	> 20 mt	30	5
	"B"	> 20 mt	20	4
	"C"	> 20 mt	15	3
	"D"	> 20 mt	10	2

Tab. 5 DIMENSIONAMENTO DELLA ZONA DI RISPETTO NELLE DIVERSE SITUAZIONI IDRODINAMICHE IDENTIFICATE

Situazione	Estensione a monte	Note
"A"	Tutta l'area dell'alimentazione	Efficacia limitata
"B"	Tutta l'area dell'alimentazione	Riducibile a 2.000 mt in caso di acquifero protetto in superf.
"C"	400 mt	
"D"	200 mt	

1.5. Classificazione della qualità delle acque sotterranee in funzione di uso e trattamenti

Lo scopo ultimo che la politica di tutela delle risorse idriche si prefigge è di mantenere inalterate le caratteristiche e quindi disponibili per i vari usi. La qualità naturale non è sempre ottimale e spesso necessita di trattamenti per destinare successivamente le acque a vari scopi. La pianificazione d'uso delle risorse idriche sotterranee deve quindi poter consentire una valutazione sufficientemente precisa, ma rapida e su grande scala della qualità da associare ai criteri di scelta derivati dalla valutazione di vulnerabilità e rischio. Occorre, in definitiva, sapere: quali corpi idrici proteggere; per quali fini e con che mezzi.

Una proposta di classificazione sintetica recentemente messa a punto in Italia per essere utilizzata a grande scala, quando si abbia una minima disponibilità di dati di qua-

lità, come spesso accade se non sono attivi sistemi di monitoraggio già consolidati.

La classificazione, per i suoi specifici presupposti, si deve basare su pochi parametri analitici che svolgono un ruolo significativo nella caratterizzazione delle condizioni generali di qualità delle risorse sotterranee, riferite alle situazioni idrogeochimiche, soprattutto naturali e ad alcune modalità di contaminazione di area vasta. Si ritiene infatti che tale classificazione non debba tenere conto di stati di inquinamento generati da particolari sostanze di origine esclusivamente antropica (esempio solventi, pesticidi etc.). La metodologia integra aspetti a contenuto normativo con altri di carattere tecnico-industriale per il miglioramento qualitativo dell'acqua prima dell'uso, facendo riferimento soprattutto a quello idropotabile.

A base della classificazione proposta sono stati presi i limiti contenuti nella normativa italiana per le acque potabili, che dà attuazione alla direttiva CEE 80/778.

Sono stati considerati alcuni parametri chimico-fisici e alcuni di quelli relativi a sostanze indesiderabili che vengono generalmente determinati nella routine laboratoristica per la determinazione della potabilità (tab. 6).

Tab. 6 PARAMETRI PER LA DETERMINAZIONE DELLA POTABILITA'

PARAMETRI CHIMICO-FISICI				
Parametri	Unità di misura	Valori-guida (VG)	Concentr. massima ammissib. (CMA)	Osservazioni
Cond. elettr.	$\mu S/cm$ a 20 °C	400	-	In corrispondenza con la mineralizzazione delle acque. Valore corrispondente alla resistività espressa in ohm/cm: 2.500
Cloruri	mg/l Cl	25	-	Concentrazione che è opportuno non superare: 200 mg/l
Solfati	mg/l SO ₄	25	250	
Durezza tot. (TH)	°F	-	-	Valori consigliati: da 15 a 50 °F

La scelta dei parametri è stata guidata da alcune considerazioni sullo specifico ruolo e significato degli stessi nel profilo idrochimico delle acque sotterranee.

In particolare:

i parametri chimico-fisici indicano generalmente una condizione naturale delle

acque, essendo correlabili a particolari situazioni idrogeochimiche e, solo, occasionalmente, a scandimento quantitativo indotto antropicamente (esempio: TH levata per eccessivi apporti organici al suolo; Ci connesso a liquami urbani; SO_4 proveniente da concimazioni);

- i Nitrati sono parametro guida di una contaminazione diretta da suoli coltivati, ma indicano, in generale, anche una sofferenza dell'acquifero per un eccesso di carico antropico diffuso in aree vulnerabili;
- Ammoniaca, Ferro e Manganese (congiuntamente a valori molto bassi o negativi del potenziale redox) sono spesso associati ad acquiferi confinati ed a lento ricambio, con acque soggette a fenomeni modificatori dovuti ad un ambiente riducente; solo in condizioni idrogeologiche opposte la loro presenza, in concentrazione sensibile, è riferibile a fenomeni degenerativi antropici.
- A questi criteri di scelta dei parametri si è sovrapposto quello di usabilità immediata o non della risorsa sotterranea a vari fini: potabili, industriali e irrigui. In questo ambito si sono considerati i possibili trattamenti generalmente utilizzati per migliorare le caratteristiche qualitative delle acque.

La classificazione proposta (tabella 4, sezione A) differenzia i valori di ciascun parametro in tre classi cui corrispondono caratteristiche qualitative delle acque decrescenti: ottimale (classe A), media (classe B), scadente (classe C). Per la definizione degli intervalli di valori delle varie classi sono stati considerati, ove presenti, il Valore Guida (VG), che è definito il valore ottimale a cui tendere, e la Concentrazione Massima Ammissibile (CMA), valore da non superare mai, previsti per i vari parametri. Nel caso che nelle norme non fossero indicati tali valori si è proceduto alla loro definizione per induzione, sulla base delle note e osservazioni contenute nell'allegato stesso e/o dei criteri di buona tecnica. I parametri sono stati riuniti in due gruppi (1 e 2) per differenziare le acque da sottoporre a trattamenti specifici per i singoli parametri (gruppo 1), dalle acque per le quali è normalmente previsto un trattamento ossidativo semplice o spinto (gruppo 2). Il giudizio d'uso connesso alle diverse classi è riportato nella sezione B della tabella 7.

Mediante la classificazione proposta si individuano sei classi possibili di qualità delle acque sotterranee. Operativamente dalle analisi disponibili, con l'uso della tabella 7 sezione A, si riferiscono i valori di ciascun parametro agli intervalli previsti ricavando la relativa classe; l'operazione è ripetuta per tutti i parametri dei due gruppi.

Per convenzione nella definizione della qualità delle acque si indica prima la classe dei parametri del gruppo 1. Ad esempio qualora tutti i valori dei gruppi 1 e 2 rientrino nella classe A si avrà un'acqua di tipo A1 A2; se *solo un* parametro del gruppo 1 rientra negli intervalli della classe B si avrà un'acqua di tipo B1A2. Si ricorda che la classificazione proposta non tiene conto degli stati di inquinamento generati da particolari sostanze di origine esclusivamente antropica (es. solventi, pesticidi, etc...).

Tab. 7 CLASSI DI QUALITA' DELLE ACQUE SOTTERRANEE

		GRUPPO PARAMETRI							
		1 (chimico-fisici)					2 (sostanze indesiderab.)		
Giudizio	Classe	TH (°F)	Cond. El. (µS/cm)	SO ₄ (mg/l)	Cl (mg/l)	NO ₃ (mg/l)	Fe (mg/l)	Mn (mg/l)	NH ₄ (mg/l)
ottimale	A	15*-30**	<1000**	<50***	<50	<10**	<0,05	<0,02	<0,05
media	B	30*-50	1000**-2000	50***-250	50-200	10**-50	0,05-0,2	0,02-0,05	0,05-0,5
scadente	C	>50	>2000	>250	>200	>50	>0,2	>0,05	>0,5
Note: * Valore minimo consigliato ** Valore indicativo intermedio tra Concentrazione massima ammissibile (CMA) e Valore Guida (VG) (DPR 236/88) *** Valore doppio rispetto al VG									
B) GIUDIZIO D'USO									
A	Acqua potabile senza alcun trattamento; idonea a quasi tutti gli usi industriali ed irrigui								
B	Acqua potabile senza alcun trattamento; alcune limitazioni per gli usi industriali ed irrigui								
C	Acqua non idonea ad essere utilizzata tal quale per usi potabili e con limitazioni per altri usi C1: da sottoporre a trattamenti specifici C2: da sottoporre a trattamento di ossidazione semplice o spinta								

1.6. Conclusioni

I criteri ed i metodi che sono stati sommariamente descritti rappresentano capitoli di un complesso sistema di approccio alla tutela dei corpi idrici sotterranei, alle scelte di pianificazione territoriale e di sfruttamento delle acque sotterranee, attraverso i quali i Tecnici debbono fornire al "Decisore Politico" tutte le informazioni necessarie alle scelte che egli deve compiere.

Per questo riteniamo importante sottolineare la necessità di un lavoro interdisciplinare tra le varie professionalità impegnate, che operino congiuntamente, cercando di trasferire in sede applicativa i risultati delle ricerche e degli studi più avanzati.

Si può in tal modo realizzare un uso razionale delle risorse del territorio, armonizzato con le esigenze dello sviluppo socio-economico.

E' questo un obiettivo primario per i paesi europei, senza ignorare le responsabilità che essi hanno nei confronti dei Paesi in via di sviluppo.

BIBLIOGRAFIA

- ZAVATTI A. Ambiente Protezione, Risanamento, 2 vol., 1986. Pitagora Editrice, Bologna.
- FRANCANI, F. CIVITA M.. Proposta di normativa per l'istituzione delle fasce di rispetto delle opere di captazione di acque sotterranee. Geograph Milano, 1988.
- ZAVATTI A. Studi sulla vulnerabilità degli acquiferi, vol. 2, 1990. In: Quaderni di tecniche di protezione ambientale, n. 11, Pitagora Ed., Bologna.
- PALTRINERI N., PELLEGRINI M., ZAVATTI A. Studi sulla vulnerabilità degli acquiferi, vol. 2, 1990. In: Quaderni di tecniche di protezione ambientale, n. 12, Pitagora Ed.
- Un metodo di valutazione dell'impatto di tracciati autostradali su acquiferi vulnerabili. Atti del 2° convegno Geo-idrologia - Firenze, 1993
- CIVITA M., DAL PRAÀ M., FRANCANI V., GIULIANO G., OLIVERO G., PELLEGRINI M., ZAVATTI A. Proposta di classificazione e mappatura della qualità delle acque sotterranee. *Inquinamento* 1993, 12: 8-17.
- ZAVATTI A. Studi sulla vulnerabilità degli acquiferi, vol. 6, 1994. In: Quaderni di tecniche di protezione ambientale, n. 33, Pitagora Ed., Bologna.
- CIVITA M. Legenda unificata per le carte della vulnerabilità all'inquinamento dei corpi idrici sotterranei. Pitagora Ed., 1990, Bologna
- CIVITA M. Le carte della vulnerabilità degli acquiferi nell'inquinamento: Teoria e Pratica. Studi sulla vulnerabilità degli acquiferi, vol. 7. In: Quaderni di tecniche di protezione ambientale, n. 31, Pitagora Ed., Bologna.
- ZAVATTI A. Aquifer Vulnerability and monitoring of groundwater quality for enhanced water supply Proceeding of the seminar: "*Perspectives in water resources in Asia*". New Delhi (India), 1992.
- ZAVATTI A. La determinazione degli effetti dell'ambiente antropizzato sulle acque naturali. Atti del Convegno: "*Acque naturali, materia prima o risorse ambientali*", 1994. ACOSER.

*Direttore reggente dell'Istituto Superiore di Sanità
e Responsabile scientifico: Aurelia Sargentini*

Direttore responsabile: Vilma Alberani

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, marzo 1997 (n. 1) 8° Suppl.